

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Nachweis des DNA-Reparaturdefektes bei Ataxia teleangiectasia Patienten

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von: Lena Mareike Kaiser
geboren am: 02.10.1986 in Kaiserslautern

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	4
II. Abbildungsverzeichnis.....	6
III. Tabellenverzeichnis.....	8
1. Zusammenfassung/Summary.....	10
2. Einleitung.....	12
2.1 DNA-Doppelstrangbrüche.....	12
2.1.1 Wirkung ionisierender Strahlung.....	12
2.1.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	13
2.2 Ataxia teleangiectasia.....	16
2.2.1 Krankheitsbild bei ATM-Homozygoten.....	16
2.2.2 Krankheitsbild bei ATM-Heterozygoten.....	18
2.3 Das ATM-Protein.....	19
2.3.1 Aufbau.....	19
2.3.2 Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche.....	20
2.3.3 γ H2AX im Bezug zu ATM.....	23
2.3.4 53BP1 im Bezug zu ATM.....	24
2.4 Ziele der Arbeit.....	25
3. Material und Methodik.....	26
3.1 Blutprobenbereitstellung.....	26
3.2 Patientenkollektiv.....	26
3.3 Lymphozytenseparation und Aufbereitung.....	26
3.4 Einfrieren der Lymphozyten.....	27
3.5 Auftauen der Lymphozyten.....	28
3.6 Bestrahlung.....	28
3.7 Fixierung und Permeabilisierung.....	28
3.8 Immunfluoreszenzfärbung.....	29
3.8.1 Antikörper-Inkubation.....	29
3.8.2 Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie.....	31
3.9 γ H2AX-, 53BP1- und ATM-Foci-Analyse.....	31
3.10 Statistik.....	33

3.11	Verwendete Geräte und Materialien.....	34
3.11.1	Geräte.....	34
3.11.2	Verbrauchsmaterialien und Behälter.....	35
3.11.3	Chemikalien.....	36
4.	Ergebnisse.....	37
4.1	Mittlere Foci-Anzahl im zeitlichen Verlauf.....	37
4.2	Prozentualer Anteil der Zellen, die Foci aufweisen im zeitlichen Verlauf.....	41
4.3	Vergleich der Immunfluoreszenzfärbungen untereinander.....	43
5.	Diskussion.....	49
5.1	Betrachtungen der Methodik.....	49
5.1.1	Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der γ H2AX- Immunfluoreszenzfärbung.....	49
5.1.2	Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der 53BP1- Immunfluoreszenzfärbung.....	51
5.1.3	Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der ATM- Immunfluoreszenzfärbung.....	51
5.2	Diskussion der Versuchsergebnisse.....	52
5.2.1	Vergleich der Reparaturkapazität.....	52
5.2.1.1	Vergleich der ATM-Homozygoten und Heterozygoten.....	52
5.2.1.2	Vergleich der ATM-Heterozygoten und Gesunden	53
5.2.1.3	Vergleich der ATM-Homozygoten und Gesunden	54
5.2.1.4	Vergleich der unbestrahlten Kontrollzählungen.....	55
5.2.1.5	Zusammenfassende Interpretation.....	55
5.2.2	Vergleich der Immunfluoreszenzfärbungen.....	56
5.2.2.1	Vergleich der γ H2AX- und der 53BP1-Färbung.....	56
5.2.2.2	Vergleich der γ H2AX- und der ATM-Färbung.....	56
5.2.2.3	Vergleich der 53BP1- und der ATM-Färbung.....	57
5.2.2.4	Zusammenfassende Interpretation.....	58
5.3	Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	59
6.	Literaturverzeichnis.....	60
7.	Dank.....	69
8.	Lebenslauf.....	70

I. Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53-binding protein 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
bp	Basenpaar
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BRCT-Domäne	Breast cancer susceptibility gene-1 carboxyl terminus domain
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
CHK2	Checkpoint kinase 2
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAT-Domäne	Genannt nach FRAP, ATM und TRRAP
FATC-Domäne	Genannt nach FRAP, ATM, TRRAP, C-terminal
FBS	Fötales bovines Serum
FHA-Domäne	Forkhead-homology associated domain
γ H2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX
Gy	Gray
HR	Homologe Rekombination
IgA, IgE, IgG2	Immunglobulin A, Immunglobulin E, Immunglobulin G2
IRIF	Ionizing radiation induced foci
kb	Kilobasenpaare
keV	Kiloelektronenvolt
Ku70/80	Ku-Protein (Heterodimer-Protein aus Ku70 und Ku80)
LSM	Lymphocyte separation medium
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint protein 1
MDM2	Mouse double minute 2
MDMX	Mdm4 p53 binding protein homolog
MeV	Megaelektronenvolt
Mre11	Meiotic recombination 11
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
mRNA	Messenger RNA
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NHEJ	Nicht-homologes End-joining
NS	Normalserum
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PBS	Phosphate buffered saline
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PIKK	Phosphatidylinositol-3-Kinase verwandten Kinasen
PNK	Polynukleotidkinase
PP2A	Protein phosphatase 2A
PP5	Protein phosphatase 5
Rad51	RAD51 homolog
Rad52	RAD52 homolog
RNF8	Ring finger protein 8

RPA	Replication protein A
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium)
SSB	Einzelstrangbruch (single strand break)
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
TIP60	Histone acetyltransferase TIP60
TxRed	Texas Red
WIP1	Wild-type p53-induced phosphatase
XLF	XRCC4-like factor
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4

II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** DSB-Reparatur durch HR und NHEJ (Weterings und Chen, 2008)
- Abbildung 2:** Aufbau des ATM-Proteins (Lavin, 2008)
- Abbildung 3:** ATM-Aktivierung (Lavin, 2008)
- Abbildung 4:** Signalkaskade am Beispiel des G1-S-Checkpoints (Lavin und Kozlov, 2007)
- Abbildung 5:** Darstellung der mittleren Foci-Anzahl in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 1 Gy am Beispiel der γ H2AX-Färbung bei $ATM^{-/-}$, $ATM^{+/-}$ und $ATM^{+/+}$
- Abbildung 6:** Darstellung der mittleren Foci-Anzahl in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 2 Gy am Beispiel der γ H2AX-Färbung bei $ATM^{-/-}$, $ATM^{+/-}$ und $ATM^{+/+}$
- Abbildung 7:** Prozentualer Anteil der Zellen, die 53BP1-Foci aufweisen in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 1 Gy bei $ATM^{-/-}$, $ATM^{+/-}$ und $ATM^{+/+}$
- Abbildung 8:** Prozentualer Anteil der Zellen, die 53BP1-Foci aufweisen in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 2 Gy bei $ATM^{-/-}$, $ATM^{+/-}$ und $ATM^{+/+}$
- Abbildung 9:** Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 1 Gy bei den $ATM^{-/-}$
- Abbildung 10:** Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 2 Gy bei den $ATM^{-/-}$
- Abbildung 11:** Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 1 Gy bei den $ATM^{+/-}$

- Abbildung 12:** Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 2 Gy bei den ATM^{+/-}
- Abbildung 13:** Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 1 Gy bei den ATM^{+/+}
- Abbildung 14:** Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit nach Bestrahlung mit 2 Gy bei den ATM^{+/+}
- Abbildung 15:** Immunfluoreszenzdoppelfärbung der DNA-Doppelstrangbrüche in Lymphozyten von ATM^{-/-}, ATM^{+/-} und ATM^{+/+} nach Bestrahlung mit 2 Gy und Fixierung nach 8 h

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Patientenkollektiv
Tabelle 2:	Primärantikörper
Tabelle 3:	Sekundärantikörper
Tabelle 4:	Filtersätze
Tabelle 5:	Fluoreszenzfarbstoffe
Tabelle 6:	Anzahl der Versuche der ATM ^{-/-}
Tabelle 7:	Anzahl der Versuche der ATM ^{+/-}
Tabelle 8:	Anzahl der Versuche der ATM ^{+/+}
Tabelle 9:	Verwendete Geräte
Tabelle 10:	Verwendete Verbrauchsmaterialien und Behälter
Tabelle 11:	Verwendete Chemikalien
Tabelle 12:	Prüfung der Signifikanz mit einseitigem Mann-Whitney-Test; Vergleich der Ergebnisse der γ H2AX-Färbung von ATM ^{-/-} , ATM ^{+/-} und ATM ^{+/+} der unbestrahlten Kontrollen und nach Bestrahlung mit 1 Gy
Tabelle 13:	Prüfung der Signifikanz mit einseitigem Mann-Whitney-Test; Vergleich der Ergebnisse der γ H2AX-Färbung von ATM ^{-/-} , ATM ^{+/-} und ATM ^{+/+} nach Bestrahlung mit 2 Gy
Tabelle 14:	Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test; Vergleich der Ergebnisse der ATM ^{-/-} bei den verschiedenen Färbungen der unbestrahlten Kontrollen und nach Bestrahlung mit 1 Gy
Tabelle 15:	Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test; Vergleich der Ergebnisse der ATM ^{-/-} bei den verschiedenen Färbungen nach Bestrahlung mit 2 Gy

-
- Tabelle 16:** Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test; Vergleich der Ergebnisse der ATM^{+/-} bei den verschiedenen Färbungen der unbestrahlten Kontrollen und nach Bestrahlung mit 1 Gy
- Tabelle 17:** Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test; Vergleich der Ergebnisse der ATM^{+/-} bei den verschiedenen Färbungen nach Bestrahlung mit 2 Gy
- Tabelle 18:** Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test; Vergleich der Ergebnisse der ATM^{+/+} bei den verschiedenen Färbungen der unbestrahlten Kontrollen und nach Bestrahlung mit 1 Gy
- Tabelle 19:** Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test; Vergleich der Ergebnisse der ATM^{+/+} bei den verschiedenen Färbungen nach Bestrahlung mit 2 Gy
- Tabelle 20:** Darstellung der bei den drei Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten Foci-Mittelwerte und Standardabweichungen zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten bei den ATM^{-/-}
- Tabelle 21:** Darstellung der bei den drei Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten Foci-Mittelwerte und Standardabweichungen zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten bei den ATM^{+/-}
- Tabelle 22:** Darstellung der bei den drei Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten Foci-Mittelwerte und Standardabweichungen zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten bei den ATM^{+/+}

1. Zusammenfassung

Zielsetzung: An Ataxia teleangiectasia erkrankte Patienten reagieren sehr sensibel auf ionisierende Strahlen. Dies ist auf eine eingeschränkte Fähigkeit DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) reparieren zu können zurückzuführen. Die grundlegende Ursache ist eine Mutation des Gens, welches für das ATM-Protein (ataxia telangiectasia mutated) kodiert. Dieses nimmt eine zentrale Stellung bei der Erkennung von DNA-DSB sowie nachfolgender Signalkaskade ein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DSB-Reparaturkapazität von homozygoten ($ATM^{-/-}$) im Vergleich zu heterozygoten ($ATM^{+/-}$) und gesunden Menschen ($ATM^{+/+}$) analysiert. Des Weiteren wurde die Eignung von verschiedenen DSB-Markern (γ H2AX, 53PB1 und ATM) untersucht.

Material und Methoden: Als Untersuchungsmaterial dienten aus Blut separierte Lymphozyten der verschiedenen Genotypen ($ATM^{-/-}$, $ATM^{+/-}$ und $ATM^{+/+}$), die mit einer Dosis von 1 Gy bzw. 2 Gy bestrahlt wurden. Anschließend wurden sie zu definierten Zeitpunkten fixiert. DNA-DSB wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Hierfür wurden drei verschiedene DSB-Markern (γ H2AX, 53PB1 und ATM) verwendet und die Foci ausgezählt.

Ergebnisse: Die ATM-Homozygoten wiesen eine höhere Akkumulierung von DSB im Vergleich zu den anderen Genotypen auf. Eine etwas erhöhte DSB-Persistenz zeigte sich auch bei den ATM-Heterozygoten. Die zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten ermittelten Foci-Zahlen der γ H2AX-Färbung entsprachen bei allen drei Genotypen denen der 53PB1-Färbung. Die ATM-Färbung ergab bei den gesunden Individuen Foci-Zahlen, die mit den Auszählungen der anderen beiden Immunfluoreszenzfärbungen vergleichbar waren, nicht aber bei den ATM-Homozygoten und ATM-Heterozygoten.

Schlussfolgerung: Die ATM-Homozygoten sowie in geringerem Maße auch die ATM-Heterozygoten weisen eine verminderte Fähigkeit DNA-DSB reparieren zu können auf, welche sich mittels der Immunfluoreszenz-Foci-Analyse mit wenig Aufwand nachweisen lässt und eine individuelle Einschätzung der DNA-Reparaturkapazität ermöglicht. Dies könnte unter anderem vor Einleitung einer Strahlentherapie von Relevanz sein. Während die γ H2AX- bzw. 53PB1-Foci-Analyse unabhängig vom Genotyp ein geeignetes Verfahren hierfür darstellt, ist die ATM-Foci-Analyse bei Individuen mit eingeschränkter bzw. mangelhafter Funktion des ATM-Proteins nur mäßig anwendbar.

Summary: Verification of the DNA repair defect of patients with Ataxia telangiectasia

Purpose: Patients suffering from Ataxia telangiectasia respond very sensitively to ionizing radiation. This can be traced back to the impaired ability to repair DNA double-strand breaks (DSBs). The basic reason is a mutation of the gene, which codes for the ATM protein (ataxia telangiectasia mutated). This component is critical for the detection of DNA DSBs and the following signaling cascade. In this study, the DSB repair capacity of ATM^{-/-} homozygotes compared to ATM^{+/-} heterozygotes and healthy ATM^{+/+} individuals, was analyzed. Furthermore, the suitability of different DSB markers for DSB analysis (γ H2AX, 53PB1 and ATM) was examined.

Materials and methods: Blood lymphocytes of the different genotypes (ATM^{-/-}, ATM^{+/-} and ATM^{+/+}) were isolated and irradiated with 1 Gy or 2 Gy. Afterwards, they were fixed at definite time points. DNA DSBs were made visible by immunofluorescence staining. For that, three different DSB markers (γ H2AX, 53PB1 and ATM) were used and the foci were scored.

Results: ATM^{-/-} homozygotes showed an elevated accumulation of DSBs in contrast to the other genotypes. ATM^{+/-} also showed a slightly elevated persistence of DSBs. The γ H2AX foci numbers detected for all three genotypes at the definite time points corresponded to those of the 53PB1 foci. With ATM staining, foci numbers were comparable to the other immunofluorescence staining only in the ATM^{+/+} phenotype, but not in ATM^{-/-} homozygotes and ATM^{+/-} heterozygotes.

Conclusion: ATM^{-/-} homozygotes and to a lesser degree ATM^{+/-} heterozygotes showed an impaired ability to DSB repair, which can be verified with little effort by using immunofluorescence foci analysis and allows an individual assessment of the DNA repair capacity. This could be of relevance before the initiation of radiotherapy. While the γ H2AX or 53PB1 foci analysis is an appropriate method independent of the genotype, the ATM foci analysis is less appropriate for individuals with impaired or deficient function of the ATM protein.

2. Einleitung

2.1 DNA-Doppelstrangbrüche

2.1.1 Wirkung ionisierender Strahlung

Ionisierende Strahlung wirkt sich in verschiedener Weise schädigend auf die Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus.

Grundsätzlich kann man ionisierende Strahlung in elektromagnetische Strahlung (z.B. γ -Strahlung und Röntgenstrahlung) und Teilchenstrahlung (z.B. Elektronen, Protonen und α -Teilchen) untergliedern. Röntgen- und γ -Strahlung bestehen aus Photonen. Diese treten entweder durch Absorption oder durch Streuung in Wechselwirkung mit Materie, wobei meist freie, elektrisch geladene Sekundärteilchen wie Elektronen und Positronen entstehen, welche wiederum die umgebende Materie ionisieren können. Daher spricht man von einer indirekt ionisierenden Wirkung der elektromagnetischen Strahlung auf Atome (Krieger und Petzold, 1992).

Es gibt verschiedene Formen der Wechselwirkungen zwischen Photonen und Materie, zum Beispiel in Form des Photoeffekts, des Compton-Effekts oder der Paarbildung. Beim Photoeffekt, der bei Strahlungsenergien bis ca. 60 keV dominiert, gibt das Photon seine gesamte Energie an ein Hüllenelektron ab (Reiser *et al.*, 2011). In der Folge löst sich dieses aus der Atomhülle und kann ionisierend auf die umgebende Materie wirken. Der Compton-Effekt überwiegt bei Strahlungsenergien zwischen 60 keV und 20 MeV (Reiser *et al.*, 2011). Dabei übergibt das Photon einen Teil seiner Energie an ein Hüllenelektron und wird aus seiner anfänglichen Richtung abgelenkt. Das Photon und das freigesetzte Elektron können weitere Ionisationen bewirken. Der Paarbildungseffekt kann bei Energien über 1,022 MeV stattfinden. Hierbei kommt es zur Absorption des Photons und es entsteht im elektrischen Feld des Atomkerns ein Elektron-Positron-Paar.

Die indirekte Strahlenwirkung elektromagnetischer Strahlung beruht vor allem auf der Radiolyse von Wasser, dem Hauptbestandteil der Zellen. Dies erfolgt durch die oben genannten Sekundärteilchen, die ionisierend auf Wassermoleküle wirken. Die so entstandenen hochreaktiven Wasserradikale können nachfolgend mit DNA und Proteinen reagieren und zu Schäden führen (Reiser *et al.*, 2011). Die DNA kann dabei auf verschiedene Weise geschädigt werden, zum Beispiel durch die Induktion von Basenschäden, Einzelstrangbrüchen (SSB), Doppelstrangbrüchen (DSB) und DNA-Cross-Links (Jeggo und Löbrich, 2006).

Die Bestrahlung mit 1 Gray (Gy) verursacht in jeder Zelle 10^5 Ionisierungen, ca. 2000 SSB und 40 DSB (Lewanski und Gullick, 2001). Gray ist die Einheit der Energiedosis und gibt die in Materie absorbierte Strahlenmenge an ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$).

DNA-Doppelstrangbrüche stellen die schwerste Form von DNA-Schäden dar. Werden sie nicht repariert, kann dies zum Zelltod führen. Aus einer fehlerhaften Korrektur können chromosomale Translokationen, genomische Instabilität und letztlich Kanzerogenese resultieren (Khanna und Jackson, 2001; Lees-Miller und Meek, 2003).

Ein DSB kommt zustande, wenn zwei SSB an gegenüberliegenden DNA-Strängen etwa 10 bis 20 bp voneinander entfernt auftreten und demzufolge meist überhängende 3' und 5' Enden entstehen (Mahaney *et al.*, 2009).

DSB können außer durch ionisierende Strahlung auch durch verschiedene Chemikalien und Chemotherapeutika ausgelöst werden (Khanna und Jackson, 2001). Auch treten sie während verschiedener zellulärer Vorgänge wie zum Beispiel der V(D)J-Rekombination, dem Immunglobulinklassen-Wechsel und der DNA-Replikation auf (Ramsden und Gellert, 1995; van Gent *et al.*, 2001; Khanna und Jackson, 2001).

In der Strahlentherapie wird ionisierende Strahlung neben der Chemotherapie und der operativen Therapie zur Behandlung maligner Tumoren angewandt (Lewanski und Gullick, 2001). Dabei treten Normalgewebs-Toxizitäten auf, deren Ausmaß von Patient zu Patient unterschiedlich stark ist (Baumann *et al.*, 2003; Rube *et al.*, 2010). Daneben ist das Ansprechen auf die Strahlentherapie aufgrund genetischer Variationen interindividuell verschieden (Gatti, 2001; Bentzen, 2006).

2.1.2 Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Bei der Reparatur von DSB, die durch ionisierende Strahlen verursacht wurden, spielen zwei Reparaturmechanismen eine maßgebliche Rolle, nämlich die Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (non-homologous end joining: NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) (van Gent *et al.*, 2001).

Da die Reparatur durch HR auf das Vorhandensein des Schwesterchromatins als unbeschädigte Vorlage angewiesen ist, findet sie nur während der späten S- und frühen G2-Phase statt (Takata *et al.*, 1998; Jeggo und Löbrich, 2006). NHEJ dagegen kommt während des ganzen Zellzykluses vor, vor allem aber während der G1- und frühen S-Phase und bedarf dabei keiner oder weniger Sequenzhomologien als Matrize (Jackson, 2002; Rothkamm *et al.*, 2003; Tichy *et al.*, 2010).

Einen Überblick der beiden Reparaturwege zeigt Abbildung 1.

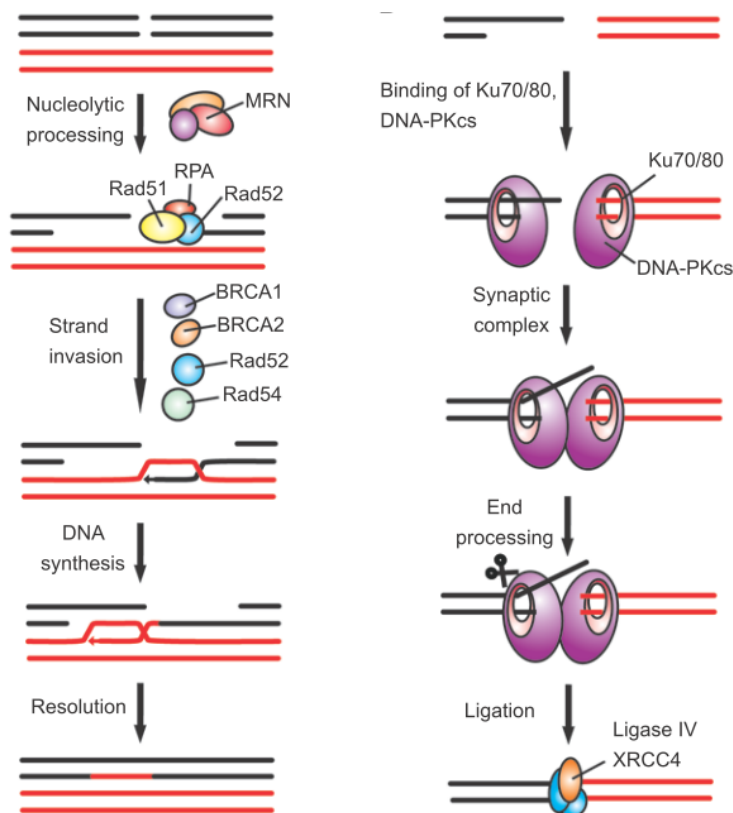


Abbildung 1: DSB-Reparatur durch HR (linke Seite) und NHEJ (rechte Seite) (aus Weterings und Chen, 2008)

Über den Mechanismus der homologen Rekombination ist eine genaue DSB-Reparatur möglich, da das homologe Schwesterchromatin ein direktes Ablesen der Sequenz erlaubt. Hierbei werden zunächst, vermutlich vermittelt durch den MRN-Komplex (Mre11-Rad50-NBS1), an den beiden Seiten des DSB überhängende Einzelstränge gebildet (Weterings und Chen, 2008). Rad51, Rad52, RPA und weitere Substrate treten mit diesen überhängenden Enden in Wechselwirkung und helfen bei der Identifizierung der identischen Sequenz des intakten Schwesterchromatins. Nach Stranginvasion und Paarung der homologen Abschnitte unter Bildung einer sogenannten Holliday-Struktur kommt es zum Strangaustausch zwischen dem beschädigten und dem unbeschädigten DNA-Bereich und zur DNA-Neusynthese mit anschließender Auflösung der Verbindung (Khanna und Jackson, 2001; Seyffert, 2003).

In Säugetierzellen stellt das NHEJ den dominierenden Reparaturmechanismus dar (Sonanda *et al.*, 2006; Lieber, 2008). In der Regel können die durch den DSB entstandenen DNA-Enden nicht einfach direkt verbunden werden, sondern werden vorher noch prozessiert, wobei auf beiden Bruchseiten Fehler beispielsweise in Form von Sequenzdeletionen auftreten können (Jackson, 2002; Mahaney *et al.*, 2009).

Der Reparaturweg beginnt mit der Anlagerung eines Ku70/80 Heterodimer an beide Seiten des DSB. Dies scheint als Gerüst für die Akkumulierung weiterer Enzyme zu dienen (Weterings und Chen, 2008). Außerdem hilft Ku dabei die gebrochenen DNA-Enden beieinander zu halten (Cary *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 2001; Rube *et al.*, 2011). Nach der Bindung an die DNA transloziert der Ku-Komplex, wodurch die DNA-Enden unter anderem zwei DNA-PKcs-Molekülen (katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase) zugänglich werden (Yoo und Dynan, 1999; DeFazio *et al.*, 2002). Die DNA-PKcs ist ein Mitglied der Phosphatidylinositol-3-Kinase verwandten Kinasen (PIKK-Familie) (Abraham, 2004). Ku und DNA-PKcs interagieren miteinander, halten als DNA-PKcs-Ku-DSB-Komplex die Enden des DSB beieinander und schützen diese vor dem Abbau durch Nukleasen (Mahaney *et al.*, 2009). DNA-PKcs vollzieht eine Autophosphorylierung und phosphoryliert daneben eine Reihe von Substraten, die bei der DNA-Schadensantwort und Reparatur eine Rolle spielen (Shrivastav *et al.*, 2009). Die Autophosphorylierung scheint der Regulation zu dienen und zur Dissoziation der DNA-PKcs vom Ku-DNA-Komplex und Inaktivierung zu führen (Chan und Lees-Miller, 1996).

Der zweite Schritt des Reparaturweges stellt wahrscheinlich die Prozessierung der DSB-Enden dar. Es werden beschädigte oder nicht-verknüpfbare End-Gruppen entfernt. Hierbei spielen viele verschiedene Enzyme eine Rolle wie zum Beispiel Artemis, DNA-Polymerase μ und λ , Polynukleotidkinase (PNK) und vermutlich viele weitere (Mahaney *et al.*, 2009).

Artemis fungiert als 5'-3' Exonuklease und in Anwesenheit der PKcs, durch die Artemis phosphoryliert wird, auch als Endonuklease. Der Artemis-PKcs-Komplex ist unter anderem bei der Prozessierung überhängender DNA-Enden beteiligt (Ma *et al.*, 2002).

Die DNA-Polymerasen μ und λ synthetisieren neue DNA und können so entstandene Lücken wieder vervollständigen.

PNK verfügt sowohl über eine 3'-DNA-Phosphatase- als auch über eine 5'-DNA-Kinase-Funktion und kann daher mitunter nicht-verknüpfbare Gruppen an den DSB-Enden entfernen (Bernstein *et al.*, 2008; Mahaney *et al.*, 2009).

Im Anschluss an die Prozessierung folgt als letzter Schritt des NHEJ die Ligation, d.h. die Verknüpfung der DNA-Enden. Diese wird durch die Ligase IV durchgeführt, die einen Komplex mit XRCC4 bildet und deren Aktivität dadurch stimuliert wird (Grawunder *et al.*, 1997). XRCC4 fördert außerdem vermutlich die Rekrutierung weiterer Reparaturproteine (Critchlow *et al.*, 1997). Daneben tritt XLF mit dem XRCC4/Ligase IV-Komplex in Wechselwirkung und fördert die Ligation der DNA-Enden (Hentges *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2007).

2.2 Ataxia teleangiectasia

2.2.1 Krankheitsbild bei ATM-Homozygoten

Erstmalig wurde das Krankheitsbild vor über 80 Jahren von Ladislav Syllaba und Kamil Henner beschrieben, die von drei Geschwistern mit progressiven Choreoathetosen und okulären Teleangiektasien berichteten (Syllaba und Henner, 1926). Es folgten Erkenntnisse von Denise Louis-Bar über ein Kind mit progressiver cerebellärer Ataxie und kutanen Teleangiektasien (Louis-Bar, 1941). Elena Boder und Robert P. Sedgwick beschäftigten sich mit acht Fällen betroffener Familien und stellten als Hauptmerkmale die progressive zerebelläre Ataxie sowie Teleangiektasien vor allem an den Konjuntiven dar (Boder und Sedgwick, 1958). Außerdem beschrieben sie das Auftreten chronischer sinopulmonaler Infekte. Durch sie wurde die Bezeichnung Ataxia teleangiectasia eingeführt. Synonym wird das Krankheitsbild Louis-Bar- oder Boder-Sedgwick-Syndrom genannt.

Die Krankheit wird autosomal-rezessiv vererbt und die Prävalenz weltweit liegt zwischen 1:40 000 und 1:100 000. Die Prävalenz heterozygoter Träger liegt etwa bei 1%.

Homozygot betroffene Kinder scheinen sich zunächst normal zu entwickeln, bevor sich zwischen dem ersten und vierten Lebensjahr eine zunehmende zerebelläre Ataxie zeigt. Dies wird zum Beispiel in Form einer Gang- und Rumpfataxie deutlich, weshalb die Patienten ab ihrem zehnten Lebensjahr häufig auf einen Rollstuhl angewiesen sind (Lavin *et al.*, 2007; Gatti *et al.*, 1993-1999). Es kann sich eine dysarthrische Sprache, eine okulomotorische Apraxie und eine Choreoathetose entwickeln (Chun und Gatti, 2004). Die ataktischen Symptome sind unter anderem auf einen Rückgang der Purkinje- und Granularzellen im Kleinhirn zurückzuführen, wobei im Verlauf auch weitere Anteile des ZNS betroffen sein können. Der MRT-Befund des Kleinhirns ist bei jungen Patienten im Allgemeinen unauffällig, jedoch zeigt sich im Verlauf eine zunehmende Atrophie (Tavani *et al.*, 2003). Die Sehnenreflexe sind bei älteren Patienten vermindert oder können ganz fehlen (Gatti *et al.*, 1993-1999).

Mit späterem Beginn, gewöhnlich zwischen dem zweiten und achten Lebensjahr, entwickeln sich okulokutane Teleangiektasien, vor allem an den Konjunktiven, im Gesichtsbereich und an den Ohrmuscheln (Lavin *et al.*, 2007). Viele homozygot Betroffene neigen zu rezidivierenden sinopulmonalen Infekten, welche auf eine Immundefizienz auf humoraler und zellulärer Ebene zurückzuführen sind (Gatti *et al.*, 1993-1999). Der Defekt auf humoraler Ebene zeigt sich unter anderem in einem Mangel an Immunglobulinen sowie einer

beeinträchtigten Antikörper-Antwort auf Pneumokokken-Polysaccharid-Impfstoffe (Sanal *et al.*, 1999). Häufig ist der Thymus unterentwickelt (Peterson *et al.*, 1964).

Etwa ein Drittel der ATM-Patienten erkrankt während des Lebens an Malignomen, vor allem an Lymphomen und Leukämien. Gerade ältere Patienten neigen aber auch zu nicht-lymphoiden Krebsarten.

Weiterhin sind viele Patienten minderwüchsig, weisen im Verlauf Zeichen einer vorzeitigen Alterung vor und entwickeln einen insulinresistenten Diabetes mellitus. Die Intelligenz ist in der Regel nicht vermindert.

Laborchemisch gibt es neben den Mutationen des ATM-Gens (ataxia telangiectasia mutated) einige mögliche Auffälligkeiten, wie beispielsweise eine erhöhte Serum-Konzentration von Alpha-Fetoprotein bei über 95% der Erkrankten, eine Verminderung von Immunglobulinen, eine erhöhte Chromosomenbruchrate unter anderem mit Translokationen zwischen Chromosom 7 und 14 sowie eine erhöhte Radiosensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen und Radiomimetika (Chun und Gatti, 2004). Diese Parameter werden neben den typischen Symptomen Ataxie und Teleangiektasie zur Diagnosestellung zu Hilfe genommen.

Die erhöhte Radiosensitivität kann mit Hilfe des "Colony survival assay" in vitro bestimmt werden und bei etwa 90% der Patienten mit einer Dosis von 1 Gy nachgewiesen werden, während bei den restlichen eine höhere Dosis gewählt werden muss (Sun *et al.*, 2002). Dabei wird die Überlebensrate einer transformierten lymphoblastoiden Zelllinie des Patienten nach Bestrahlung bestimmt, die bei an Ataxia teleangiectasia Erkrankten im Vergleich zu Gesunden stark vermindert ist.

Die Immundefizienz kann durch eine häufig vorliegende verminderte Serumkonzentration der Immunglobuline IgA, IgE und IgG2 bestätigt werden.

Es sind inzwischen über 500 unterschiedliche über das gesamte ATM-Gen verteilte Mutationen bekannt (Lavin *et al.*, 2007). Die meisten Patienten erben verschiedene Mutationen von jedem Elternteil (Chun und Gatti, 2004). In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich dabei um trunkierende Mutationen. Diese führen entweder dazu, dass die mutierte mRNA vorzeitig abgebaut und kein Protein gebildet wird oder dass verkürzte ATM-Proteine entstehen oder aber dass das mutierte Exon beim Spleißen übersprungen wird, dem so genannten Exon-Skipping (Siegenthaler und Blum, 2006). In der Tat sind bei 95% der ATM-homozygoten Menschen keine ATM-Proteine mittels Immunoblotting nachweisbar, während in über 99% der Fälle aber mRNA detektiert wird (Gatti *et al.*, 1993-1999). Etwa 10% sind Missense-Mutationen, bei denen es zum Austausch einer Aminosäure kommt. Es werden normal große Proteine gebildet, diese sind aber funktionell beeinträchtigt (Concannon, 2002).

Aus einer Mutation des ATM-Gens resultiert eine beeinträchtigte DSB-Reparatur-Kapazität und daraus ergeben sich eine Anfälligkeit für chromosomale Instabilität und eine Prädisposition zur Entwicklung von Malignomen (Lavin, 2008).

Das Krankheitsbild variiert zwar von Patient zu Patient in Beginn und Progression der Symptome, ältere Betroffene offenbaren aber nach Entwicklung des Vollbildes der Ataxia teleangiectasia einen recht homogenen Phänotyp. Allerdings gibt es abhängig vom Mutationstyp Abweichungen. So zeigen Menschen mit Missense-Mutationen in der Regel mildere Krankheitssymptome (Chun und Gatti, 2004).

Die Lebenserwartung ist mitunter davon abhängig, ob die Patienten schwere Infektionen erleiden oder an Malignomen erkranken. Viele Betroffene erreichen inzwischen das 25. Lebensjahr, aber es sind auch an Ataxia teleangiectasia erkrankte Menschen bekannt, die wesentlich älter wurden (Dörk *et al.*, 2004).

Therapeutisch gibt es zwar kurativ viele potentielle Strategien, aber bisher kann den ATM-Homozygoten nur symptomatisch geholfen werden. In Betracht kommen beispielsweise eine antibiotische Behandlung der sinopulmonalen Infekte, Immunglobulinsubstitutionstherapie bei nachgewiesenem Mangel und Medikamente, die die Symptome der Ataxie, der Dysathrie und des Tremors mindern können (Lavin *et al.*, 2007; Perlman *et al.*, 2003). Physio-, Ergotherapie und Logopädie sollten frühzeitig zum Einsatz kommen. Die Exposition mit ionisierender Strahlung sollte so weit wie möglich vermieden werden. Mindestens einmal jährlich sollte ein Check-up der Patienten erfolgen.

Die Eltern sollten bei weiterem Kinderwunsch über das Wiederholungsrisiko der Erkrankung von 25% aufgeklärt werden. Eine pränatale Diagnostik ist außerdem möglich.

2.2.2 Krankheitsbild bei ATM-Heterozygoten

ATM-heterozygote Menschen bilden keine typischen Symptome der Erkrankung aus, sind aber ebenfalls gegenüber ionisierenden Strahlen und Radiomimetika sensibler als Menschen mit 2 intakten ATM-Proteinen, wenn auch nicht in dem Ausmaß der ATM-Homozygoten (Chen *et al.*, 1978; Rube *et al.*, 2010).

ATM-Heterozygote haben im Vergleich zu Gesunden ein erhöhtes Risiko Malignome zu entwickeln (Swift *et al.*, 1976). Insbesondere besteht eine größere Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Brustkrebs bei Frauen (Swift *et al.*, 1991; Athma *et al.*, 1996; Broeks *et al.*, 2000). Des Weiteren scheint das Risiko für Darm- und Magenkrebs erhöht zu sein (Thompson *et al.*, 2005). Neuere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen vererbten ATM-Mutationen und der Prädisposition zur Entstehung von Pankreaskrebs auf (Roberts *et al.*,

2012). Ferner kommt es zu einem gehäuften Auftreten von Diabetes mellitus und die Mortalitätsrate aufgrund von Malignomen sowie ischämischen Herzkrankheiten ist erhöht (Swift, 1985).

2.3 Das ATM-Protein

2.3.1 Aufbau

Das ATM-Protein spielt eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Signaltransduktion von DNA-Doppelstrangbrüchen mit nachfolgender Regulierung der Zellzyklus-Checkpunkte, der DNA-Reparatur und/oder der Apoptose zur Erhaltung der genomischen Integrität (Löbrich und Jeggo, 2005; Lavin, 2008).

Das ATM-Gen ist auf Chromosom 11q22-33 lokalisiert (Gatti *et al.*, 1988). Es enthält 66 Exons und erstreckt sich über etwa 150 kb DNA, woraus ein Transkript aus 13 kb für das ATM-Protein, bestehend aus 3056 Aminosäuren, kodiert (Savitsky *et al.*, 1995; Uziel *et al.*, 1996). Dieses Protein ist eine Serin/Threonin-Kinase und gehört zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinase verwandten Kinasen.

Den Aufbau des ATM-Proteins zeigt Abbildung 2. Die Kinase-Domäne befindet sich nahe dem C-Terminus. Weiterhin verfügt es über eine FAT-, sowie eine FATC-Domäne, wobei letztere eine Bindungsstelle für Acetyltransferase TIP60 darstellt. TIP60 trägt zur Aktivierung von ATM bei. Das Protein verfügt über einige Ser- und Thr-Phosphorylierungsstellen sowie über drei Autophosphorylierungsstellen (Ser367, Ser1893 und Ser1981). Die Substratbindungsstelle ist N-terminal lokalisiert und insofern bedeutsam, da eine Deletion in dieser Region die Inaktivierung von ATM zur Folge hat. Die Phosphatasen PP5, PP2A und WIP1 tragen zur Kontrolle der ATM-Aktivierung bei (Lavin, 2008).

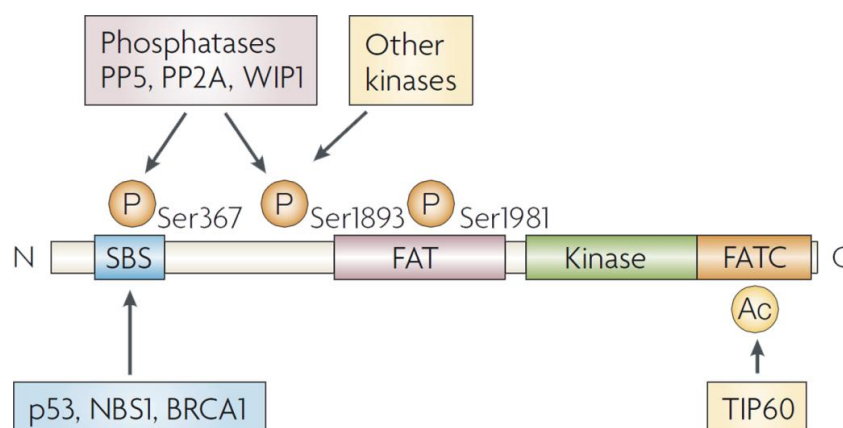


Abbildung 2: Aufbau des ATM-Proteins; P=Ser- und Thr-Phosphorylierungsstellen, SBS=Substratbindungsstelle (aus Lavin, 2008)

2.3.2 Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche

Abbildung 3 stellt die ATM-Aktivierung in Reaktion auf einen DNA-DSB, beispielsweise durch ionisierende Strahlen verursacht, dar. Zunächst wird der MRN-Komplex rekrutiert, der in Form einer MR-Heterotetramer-Struktur an die DNA bindet und die gebrochenen Enden nahe beieinander hält (de Jager *et al.*, 2001). Die Akkumulierung des MRN-Komplexes ist dabei von der Anwesenheit von MDC1 (mediator of DNA-damage checkpoint protein 1) abhängig (Goldberg *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003). Er sorgt als Sensor des DNA-Schadens für die Ansammlung von ATM am DSB, ist aber auch wichtig für die ATM-Aktivierung und nimmt vermutlich hierbei eine Adapterrolle zwischen ATM und nachgeschalteten Substraten ein (Mirzoeva und Petrini, 2003; Uziel *et al.*, 2003; Lee und Paul, 2005; Lavin, 2008). Dabei bindet ATM über den C-Terminus von NBS1 an den MRN-Komplex (Falck *et al.*, 2005; You *et al.*, 2005).

Daneben erfordert die ATM-Aktivierung, dass das Protein an DNA-Regionen bindet, die den DSB flankieren (You *et al.*, 2007).

Es gibt noch weitere Wege der ATM-Rekrutierung. Zum Beispiel bindet MDC1 über seine FHA-Domäne an ATM und über seine BRCT-Domäne an γ H2AX (phosphoryliertes H2AX) und führt durch diese Wechselwirkung zur Ansammlung von aktivierten ATM nahe der DNA-Schäden (Lou *et al.*, 2006).

ATM ist inaktiv in Form einer Dimer-Struktur. Als Reaktion auf DNA-Schäden wird es auf verschiedene Weise modifiziert. Es kommt es zur Autophosphorylierung an mindestens drei Stellen (Ser367, Ser1893 und Ser1981) sowie zur Dissoziation in zwei Monomere und so zur Aktivierung (Bakkenist und Kastan, 2003; Kozlov *et al.*, 2006). Proteinphosphatase-2A (PP2A) beugt vermutlich der Autophosphorylierung von ATM vor, wenn kein DNA-Schaden vorliegt und dissoziiert von ATM weg, wenn dieses aktiviert wurde (Goodarzi *et al.*, 2004; Lavin, 2008). Die Phosphatase WIP1 kann ebenfalls ATM dephosphorylieren und so zur Inaktivierung beitragen (Shreeram *et al.*, 2006). Eine andere Phosphatase (PP5) trägt dagegen zur Aktivierung von ATM und der Phosphorylierung nachgeschalteter Substrate bei (Ali *et al.*, 2004). Die Acetyltransferase TIP60 beteiligt sich an der Aktivierung durch eine C-terminale Acetylierung von ATM (Sun *et al.*, 2005).

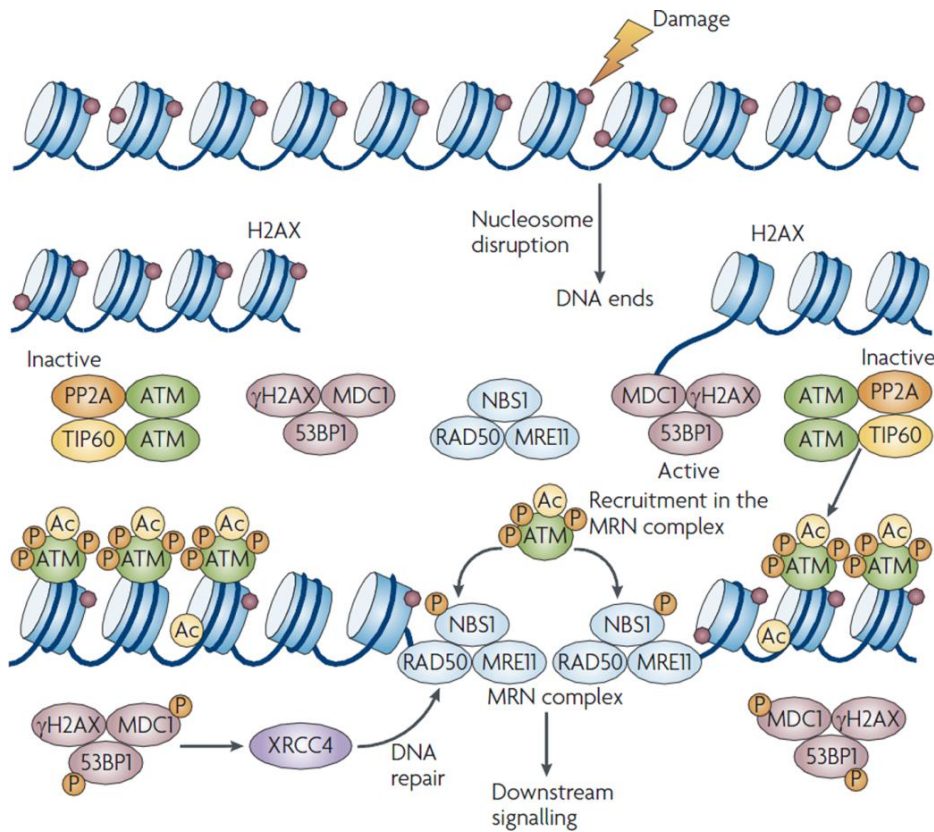


Abbildung 3: ATM-Aktivierung (aus Lavin, 2008)

Im Anschluss daran führt die ATM-Aktivierung zur Phosphorylierung einer großen Menge von Proteinen, wodurch verschiedene Signalwege beeinflusst werden, die die DNA-Reparatur, die Zellzyklus-Checkpoint-Kontrolle, die Transkription und die Apoptose betreffen (Zhou und Elledge, 2000; Shiloh, 2006; Linding *et al.*, 2007). Es sind inzwischen über 900 Phosphorylierungsstellen an über 700 Proteinen bekannt, die durch ATM und ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) phosphoryliert werden können (Matsuoka *et al.*, 2007).

Diese Proteine gliedern sich in DNA-Schadens-Sensoren (z.B. DNA-PKcs, NBS1), Vermittler (z.B. H2AX, 53BP1, MDC1), Übersetzer (z.B. CHK2, PP2A) und Effektoren (z.B. MDM2, p53) (Lavin und Kozlov, 2007).

Abbildung 4 zeigt einer dieser Signalkaskaden am Beispiel des G1/S-Checkpoints. ATM phosphoryliert nach seiner Aktivierung p53, CHK2, MDM2 und MDMX. Die drei letzteren beeinflussen die Stabilisierung von p53 in komplexer Form. Dieses Protein aktiviert p21, das wiederum die Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) hemmt. So wird der Übergang von der G1- zur S-Phase blockiert, wodurch der Zelle mehr Zeit für die Reparatur gewährt wird. Alternativ kann über p53 aber auch die Apoptose eingeleitet werden (Löbrich und Jeggo, 2005; Lavin und Kozlov, 2007).

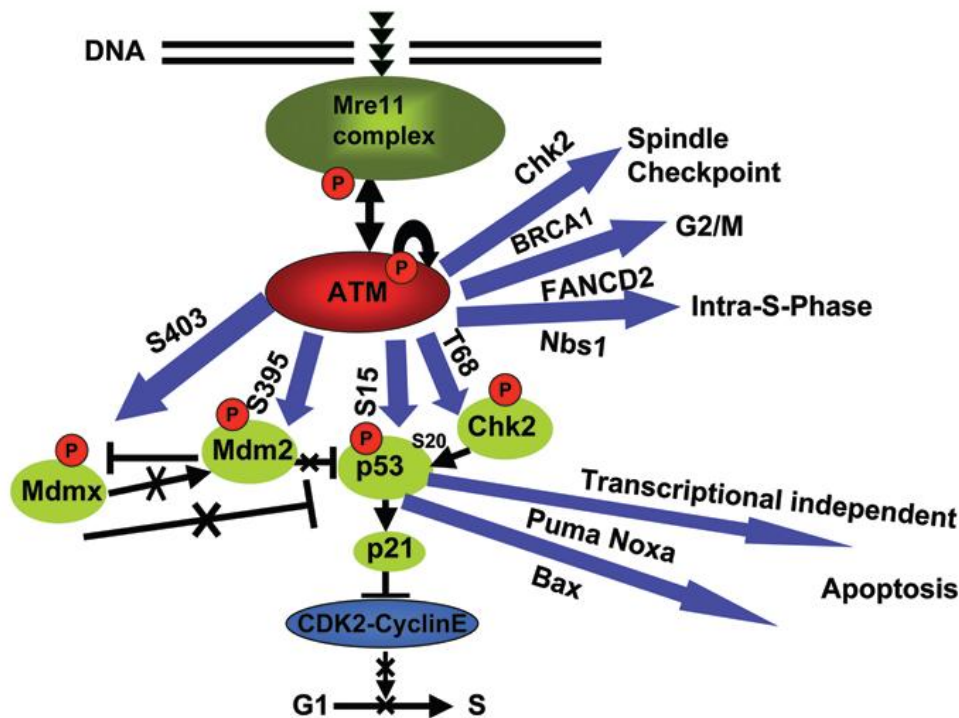


Abbildung 4: Signalkaskade am Beispiel des G1-S-Checkpoints (aus Lavin und Kozlov, 2007)

In ähnlich komplexer Weise werden der S-Phase-Checkpoint sowie der G2-M-Checkpoint kontrolliert.

Durch diese Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substraten und parallel geschalteten Signalwegen ist die Regulation der Vorgänge optimal gewährleistet. Die genaue Koordination und Kontrolle ist wichtig, um zu verhindern, dass DNA-Schäden unerkannt bleiben. Somit wird der Entstehung von Malignomen vorgebeugt.

Daneben ist ATM auch direkt für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch ionisierende Strahlen verursacht wurden, erforderlich. Hierbei ist es für die Aktivierung von Artemis wichtig. Weitere Substrate, die eine Rolle spielen, sind H2AX, 53BP1, NBS1, MRE11 und DNA-PK (Riballo *et al.*, 2004). Dieser Reparaturweg betrifft nur eine Teilmenge (10-25%) von DNA-Schäden, die mit einer langsamen Kinetik repariert werden, während die Mehrheit der DSB in der G1-Phase durch NHEJ auf schnellere Weise und unabhängig von ATM repariert werden (Riballo *et al.*, 2004). Die ATM-abhängige DSB-Reparatur scheint dabei insbesondere DNA-Schäden innerhalb des Heterochromatins zu betreffen (Goodarzi *et al.*, 2008).

2.3.3 γ H2AX in Bezug zu ATM

H2AX stellt eines der Substrate dar, die von ATM phosphoryliert werden. Es macht als ein Subtyp des Histons H2A 2-25% dieser Klasse aus und wird als frühe Reaktion auf DSB, die durch ionisierende Strahlen verursacht wurden, an Serin-139 phosphoryliert (Rogakou *et al.*, 1998). H2AX wird neben ATM auch von weiteren Proteinen der PIKK-Familie phosphoryliert wie ATR und DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) (Podhorecka *et al.*, 2010). Die Phosphorylierung betrifft Megabasen-große Chromatinregionen um den DNA-Schaden herum (Rogakou *et al.*, 1999).

Phosphoryliertes H2AX scheint ein wichtiges Signal für die nachfolgende Akkumulierung weiterer Proteine (z.B. 53BP1, BRCA1), die für die Antwort auf DSB erforderlich sind, zu sein (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Celeste *et al.*, 2003). Dabei erleichtert MDC1 die ATM-abhängige Phosphorylierung von H2AX und trägt zur Verstärkung der Signalkaskade bei (Lou *et al.*, 2006). Außerdem wird H2AX von RNF8 ubiquitiniert, wodurch 53BP1 und BRCA1 am DSB akkumulieren (Mailand *et al.*, 2007). Des Weiteren tritt γ H2AX mit NBS1 in Wechselwirkung, welche wichtig ist für die NBS1-Rekrutierung am DSB (Kobayashi *et al.*, 2002). NBS1 wiederum interagiert mit ATM und dieser Vorgang ist für die ATM-Anhäufung am DNA-Schaden notwendig (Kobayashi *et al.*, 2008).

Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops und eines spezifischen Antikörpers kann man die Ansammlung von γ H2AX am DSB als diskrete nukleäre Foci darstellen (Rogakou *et al.*, 1999). Diese bezeichnet man als IRIF (ionizing radiation induced foci). Viele weitere Substrate, die eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen, können IRIF bilden wie zum Beispiel ATM, 53BP1, BRCA1, MDC1 und der MRN-Komplex (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004).

Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Kinetik des Foci-Verschwindens und der Kinetik der DSB-Reparatur (Rothkamm und Löbrich, 2003; Rube *et al.*, 2010).

Der DSB-Reparaturdefekt bei ATM-Homozygoten zeigt sich nach Bestrahlung an einem verlangsamten Rückgang der γ H2AX-Foci sowie der verlängerten Persistenz einer erhöhten Akkumulierung der Foci im Vergleich zu gesunden Menschen, während ATM-Heterozygote mit ihren Foci-Zahlen zwischen Gesunden und Kranken liegen (Kato *et al.*, 2006; Rube *et al.*, 2010).

2.3.4 53BP1 im Bezug zu ATM

53BP1 stellt ein weiteres Substrat von ATM dar und wird als Antwort auf DSB von diesem hyperphosphoryliert (Rappold *et al.*, 2001).

Wie bereits erwähnt ist es ebenfalls in der Lage IRIF zu bilden. 53BP1 und γ H2AX sind am DSB kolokalisiert (Schultz *et al.*, 2000). Dabei ähneln sich die 53BP1- und γ H2AX-Foci sowohl hinsichtlich der Anzahl als auch der Kinetik der Foci-Bildung und -Auflösung (Rappold *et al.*, 2001).

53BP1 ist unter anderem für die Kontrolle des Intra-S-Phase-Checkpoints und des G2-M-Checkpoints sowie für die Akkumulierung von p53 und von BRCA1 bedeutsam (Wang *et al.*, 2002).

2.4 Ziele der Arbeit

Dass an Ataxia teleangiectasia erkrankte Patienten im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung aufweisen, ist schon lange Zeit bekannt (Gotoff *et al.*, 1967; Taylor *et al.*, 1975). Auch ATM-heterozygote Menschen sind gegenüber ionisierenden Strahlen empfindlicher als Menschen, die keine Mutationen der ATM-Proteine aufweisen (Chen *et al.*, 1978). Dies ist unter anderem insofern relevant, da ca. 1 % der Bevölkerung heterozygote Träger sind (Swift *et al.*, 1976).

In früheren Untersuchungen über 3 verschiedene Familien mit 4 ATM-homozygoten Patienten und 5 ATM-heterozygoten Eltern wurde anhand der Kinetik des Verschwindens von γ H2AX-Foci diese verminderte DSB-Reparaturkapazität im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe analysiert (Rübe *et al.*, 2010). Hier zeigten die ATM^{-/-} gegenüber den ATM^{+/+} eine erhöhte Radiosensitivität. Die ATM^{+/-} zeigten sich ebenfalls sensibler gegenüber ionisierenden Strahlen, jedoch nicht in dem Ausmaß der ATM-Homozygoten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der DNA-DSB-Reparaturdefekt anhand einer größeren Anzahl an Patienten im Vergleich zu heterozygoten Trägern und gesunden Individuen untersucht werden. Dazu wurden aus Blutproben separierte Lymphozyten bestrahlt um DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren und mit Hilfe dieser die DNA-Reparaturkapazität zu analysieren. Zur Untersuchung ob γ H2AX hierbei ein geeigneter Parameter zum Nachweis von DSB ist, wurden auch 53BP1- sowie ATM-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, die neben γ H2AX am DSB akkumulieren.

Folgende Fragestellungen wurden betrachtet:

- 1.) Wie stark vermindert ist die DSB-Reparaturkapazität von ATM-Homozygoten im Vergleich zu ATM-Heterozygoten sowie einer gesunden Kontrollgruppe?
- 2.) Wie groß ist der Unterschied der DSB-Reparaturkapazität zwischen ATM-heterozygoten und gesunden Individuen?
- 3.) Ergeben die Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener DNA-Doppelstrangbruch-Marker (γ H2AX, 53BP1 und ATM) bei den verschiedenen Genotypen (ATM^{-/-}, ATM^{+/-}, ATM^{+/+}) vergleichbare Foci-Zahlen als Ausdruck der gemeinsamen Lokalisation am DNA-DSB?

3. Material und Methoden

3.1 Blutprobenbereitstellung

Sämtliche Experimente wurden mit menschlichen Lymphozyten durchgeführt, die aus heparinisiertem Vollblut separiert wurden.

Die Blutproben der ATM-Patienten und deren Eltern wurden vom Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zu Verfügung gestellt.

Der Transport der NH₄-Heparin-Monovetten (8 ml) zum Universitätsklinikum Homburg/Saar erfolgte in einem mit 37°C warmen Wasser gefüllten Dewargefäß, da die Lymphozyten gegenüber Temperaturschwankungen sehr empfindlich sind.

Das Blut der gesunden Individuen wurde direkt in Homburg abgenommen.

Insgesamt wurden die Versuche an Blutproben von 17 ATM-Homozygoten, 18 ATM-Heterozygoten und 5 gesunden Probanden durchgeführt.

Die Lymphozyten als ausdifferenzierte Zellen befanden sich zu 80 bis 90 % in der G₁-Phase des Zellzykluses, das mit Hilfe der Propidiumiodid-Färbung am FACS bestätigt werden konnte. Propidiumiodid kann als basischer Farbstoff gut in den sauren Zellkern gelangen und mit der DNA interkalieren. Bei der Auswertung am Cytometer variiert die Fluoreszenzintensität abhängig vom DNA-Gehalt der Zelle und lässt so einen Rückschluss auf die Zellzyklusphase zu (Lindl und Gstraunthaler, 2008).

3.2 Patientenkollektiv

Eine Übersicht über Alter und Geschlecht des Patientenkollektivs zeigt Tabelle 1.

	Durchschnittsalter in Jahren und Monaten	Anzahl ♀	Anzahl ♂
ATM-Homozygote	14,7 (3,2-32,0)	6	11
ATM-Heterozygote	49,6 (27,7-61,1)	10	8
Gesunde Kontrollen	21,0 (10,2-41,7)	5	1

Tabelle 1: Patientenkollektiv

3.3 Lymphozytenseparation und Aufbereitung

Die Separation der Lymphozyten erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurden 6 ml Percoll, das hierfür Zimmertemperatur haben sollte, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Es wurden 6 ml des heparinisierten Vollbluts im Verhältnis 1:1 mit RPMI-Medium

gemischt. Das RPMI-Medium aus dem Kühlschrank musste zuvor im Wärmebad auf 37°C erwärmt werden. Die Mischung erfolgte in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen. Anschließend wurden 6-8 ml des Blut-RPMI-Gemisches vorsichtig unter Vermeidung einer starken Durchmischung auf das Percoll gegeben. Die Zellen wurden für 20 min bei 1200 g, bei Zimmertemperatur und ohne Bremse abzentrifugiert. Die Lymphozytenseparation erfolgt dabei aufgrund der unterschiedlichen Dichtegradienten der einzelnen Zelllinien im Vergleich zum Percoll. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren infolge ihres höheren spezifischen Gewichtes am Grund des Röhrchens, wohingegen Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten wegen ihres geringeren spezifischen Gewichts eine trübe Zellschicht oberhalb der Percollschicht bilden (Mueller-Eckhardt und Kiefel, 2004).

Unter Verwerfung des Überstandes wurde die lymphozytenreiche Schicht vorsichtig abgenommen und in ein neues 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, in welches zuvor 2 ml PBS vorgelegt worden waren um die Zellen darin zu waschen. Im nächsten Schritt wurde das Zellgemisch für 10 min bei Raumtemperatur und 300 g mit Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht ein lymphozytenreicher Zellpellet am Grund des Zentrifugenröhrchens, wohingegen der Überstand noch restliche Thrombozyten enthält und abgegossen wird (Lindl und Gstraunthaler, 2008).

Es folgte eine erneute Waschung in 2 ml PBS mit nachfolgender Zentrifugation bei gleicher Einstellung für 10 min. Sollte der weitere Versuch direkt im Anschluss stattfinden, so wurde der Lymphozyten-Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 5 ml RPMI aufgenommen und bei 37°C und 5 % Stickstoff im Brutschrank kultiviert.

3.4 Einfrieren der Lymphozyten

Durch Kryokonservierung ist die Lagerung von Zellen über Jahre möglich.

Lymphozyten, die zum Einfrieren bestimmt waren, wurden im Anschluss an die Zentrifugation nach Abkippen des Überstandes mit zuvor vorbereitetem Einfriermedium gemischt. Dieses Medium bestand im Verhältnis 1:9 aus DMSO und RPMI (Kulturmedium). DMSO verhindert als Frostschutzmittel die Kristallbildung intra- und extrazellulär sowie zum Teil die Dehydratation des Zytoplasmas (Lindl und Gstraunthaler, 2008).

Die Aufbewahrung erfolgte in einem 1,8 ml-Cryotube-Röhrchen. Dieses wurde in einer mit 100 % Isopropylalkohol gefüllten Einfriersammelbox mit Abkühlung um 1°C/min auf -80°C eingefroren. Das stufenweise Einfrieren soll Schäden durch intrazelluläres Gefrieren, Dehydrierung und Konzentrationsänderungen gelöster Stoffe vermeiden (Schmitz, 2009).

Anschließend wurden die Proben in einer Kryobox bei -196°C in Flüssigstickstoff aufbewahrt.

3.5 Auftauen der Lymphozyten

Das Auftauen der Lymphozyten sollte möglichst zügig geschehen, da das Gefrierschutzmittel DMSO zelltoxisch ist und schnell entfernt werden sollte (Schmitz, 2009).

Die Kryoröhrchen wurden bei 37°C im Wasserbad erwärmt bis nur noch eine kleine Eissäule in der Mitte des Röhrchens sichtbar war. Anschließend wurden sie mit 5 ml vorgewärmten RPMI in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen gemischt. Die Zellen wurden bei 300 g für 10 min mit Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C bis zum folgenden Tag aufbewahrt.

3.6 Bestrahlung

Ein Tag nach der Blutasservierung bzw. nach dem Auftauen erfolgte die Bestrahlung mittels Röntgenstrahlen mit einer Dosis von 1 Gy bzw. 2 Gy zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Eine unbestrahlte Probe pro Patient diente als Kontrolle.

Vor der Bestrahlung wurde zunächst die Lymphozyten-Zellkultur auf 3 Zellkulturflaschen verteilt (1 ml für die unbestrahlte Kontrolle, jeweils 2 ml für die Proben der 1- und 2-Gray-Bestrahlung) und mit RPMI auf 5 ml aufgefüllt.

Die Bestrahlung wurde in der Biophysik des Universitätsklinikum Homburg/Saar vorgenommen. Die Röntgenröhre hatte eine Dosisleistung von 1,45 Gy/min, wofür eine Beschleunigungsspannung von 90 kV und ein Heizstrom von 25 mA angewendet werden musste. Als Filter diente eine 2 mm Aluminiumplatte in 40 cm Abstand zum Austrittsfenster der Röntgenröhre (Kegel *et al.*, 2007; Fricke, 2008). Die Dauer der Bestrahlung lag für 1 Gy bei 41 s, für 2 Gy bei 82 s.

3.7 Fixierung und Permeabilisierung

Nach der Bestrahlung wurden die im Brutschrank inkubierten Proben zu bestimmten Zeitpunkten fixiert, nämlich nach 0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h. Dazu wurde das Lymphozyten-RPMI-Gemisch 10 min bei Raumtemperatur und 300 g mit Bremse zentrifugiert. Daraufhin wurde der Zellpellet in 100 µg PBS resuspendiert.

Anschließend wurden die Proben auf 2 Deckgläschen aufgetropft, je ein Deckgläschen für die γ H2AX- und eines für die 53BP1-Färbung. Die Deckgläschen wurden dafür in eine 6-Well-Platte gelegt. Nachdem die Lymphozyten 10 min bei Raumtemperatur sedimentieren konnten,

wurde vorsichtig 3 ml eiskaltes Methanol pro Well zugegeben und es folgte eine Fixierung für 30 min bei - 20°C.

Die Proben der ATM-Färbungen wurden in einer späteren Versuchsreihe in gleicher Weise bearbeitet mit jeweils nur einem Deckgläschen pro Zeitpunkt, wobei hierzu die Versuche nicht direkt im Anschluss an die Probenentgegennahme erfolgten, sondern ausschließlich Lymphozyten verwendet wurden, die vorher kryokonserviert worden waren.

Permeabilisiert wurden die Zellen für 1 min in Aceton bei -20°C. Im Anschluss erfolgte eine dreimalige Waschung in je 3 ml PBS/NS-Gemisch für 10 min auf dem Schüttler. Die Proben wurden über 24 h im Kühlschrank aufbewahrt.

3.8 Immunfluoreszenzfärbung

3.8.1 Antikörper-Inkubation

Zur Markierung von γ H2AX, 53BP1 und ATM wurde die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung angewandt. Dabei wird ein nicht fluorochromierter Antikörper verwendet, der spezifisch an das nachzuweisende Molekül, in diesem Fall an einen der drei verschiedenen DSB-Marker, bindet. An den Primärantikörper bindet wiederum ein spezifischer Sekundärantikörper, der fluorochromierte Eigenschaften aufweist. Der Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zur direkten Immunofluoreszenzmarkierung, bei dem der fluorochromierte Antikörper selbst an das nachzuweisende Molekül bindet, liegt darin, dass das Signal verstärkt wird, da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können. Weiterhin können Antikörper und Fluorochrome flexibler kombiniert werden (Lottspeich und Engels, 2006).

Für das Verfahren wurden die Lymphozyten nach Sammlung aller Proben mit je 40 μ l primärem Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 mit PBS/NS verdünnt, gevortext und im Anschluss 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Für die Inkubation wurden die Deckgläschen in zuvor vorbereitete Petrischalen gelegt, die mit befeuchtetem Zellstoff ausgelegt worden waren, worüber ein beschrifteter Parafilm möglichst plan gelegt worden war und so als Feuchtkammer dienten.

Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen nach Aufwärmen auf Raumtemperatur in der 6-Well-Schale erneut zweimalig für 10 min in je 3 ml PBS/NS und einmalig für die selbe Zeit in jeweils 3 ml PBS auf dem Schüttler gewaschen und zuletzt für 10 min in je 3 ml PBS/NS äquilibriert. Der Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:500 mit PBS/NS gevortext und 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Einlegen in die Feuchtkammer wurden auf jedes Deckgläschen 40 μ l Antikörper aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im

Dunkeln im Brutschrank. Nach dreimaliger 10 minütiger Waschung der Proben in 3 ml PBS auf dem Schüttler wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten nach Abtupfung übermäßiger Flüssigkeit auf Objektträger aufgebracht, auf die zuvor jeweils ein Tropfen Mounting Medium mit DAPI (etwa 3 μ l) pipettiert worden waren. DAPI dient als DNA-bindender Fluoreszenz-Farbstoff dem Sichtbarmachen von Zellkernen.

Die Proben wurden für mehrere Stunden in lichtgeschützten Sammelmappen getrocknet. Die Deckgläschen wurden mit klarem Nagellack auf dem Objektträger versiegelt. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

Neben den Einzelfärbungen wurden außerdem Doppelfärbungen vorgenommen. Die Versuchsreihe wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt, wobei die Proben mit jeweils zwei Primärantikörpern bzw. Sekundärantikörpern gleichzeitig inkubiert wurden. Hierfür wurden rot und grün fluoreszierende Sekundärantikörper kombiniert.

In folgenden Tabellen sind die angewandten Antikörper dargestellt.

Epitop	Name
γH2AX (Serin 139)	Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, mouse monoclonal IgG1 / Upstate/Millipore, Billerica, MA USA
53BP1	53BP1 IHC-00001 Ab, rabbit polyclonal, Bethyl Lab.Inc., Monthomery, TX USA
γH2AX (für Doppelfärbung)	γ H2AX IHC-00059 Ab, rabbit polyclonal, Bethyl Lab.Inc., Monthomery, TX USA
ATM (phospho S1981)	ATM ab 36810 mouse monoclonal, Abcam, Cambridge, MA USA

Tabelle 2: Primärantikörper

Epitop	Name
Mouse IgG	Alexa Fluor [®] 488 goat antimouse IgG (H+L)
Rabbit IgG	Alexa Fluor [®] 488 goat antirabbit IgG (H+L)
Rabbit IgG (für Doppelfärbung)	Alexa Fluor [®] 568 goat antirabbit IgG (H+L)

Tabelle 3: Sekundärantikörper

3.8.2 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Verwendung von Fluorochromen, welche nach Anregung Licht einer längeren Wellenlänge emittieren (Stokes, 1880-1905; Lottspeich und Engels, 2006). Das verwendete Fluoreszenzmikroskop verfügt über eine starke Lichtquelle (Quecksilberdampfampe), einen Anregungsfilter, einen strahlenteilenden Spiegel sowie einen Sperrfilter. Der Anregungsfilter und der Sperrfilter dienen dazu nur spezifische Wellenlängen des Lichts passieren zu lassen, die für das jeweilige Fluorochrom charakteristisch sind, während alle anderen Wellenlängen abgeschirmt werden (Lottspeich und Engels, 2006). Am Mikroskop kann man zwischen verschiedenen Filtersätzen manuell wechseln.

Eine Übersicht der angewandten Filter und Fluoreszenzfarbstoffe geben die folgenden Tabellen.

Bezeichnung	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
DAPI	340-380 nm	400 nm	435-485 nm
FITC	465-495 nm	505 nm	515-555 nm
TxRed	540-580 nm	595 nm	600-660 nm

Tabelle 4: Filtersätze

Farbstoff	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum
Alexa Fluor [®] 488	495 nm	519 nm
Alexa Fluor [®] 568	578 nm	603 nm
DAPI	340 nm	461 nm

Tabelle 5: Fluoreszenzfarbstoffe

3.9 γ H2AX-, 53BP1 und ATM-Foci-Analyse

Pro Patientenprobe wurden mindestens 40 Zellen bzw. bei den Kontrollzählungen mindestens 40 Foci bei 60-facher Vergrößerung ausgezählt. Dafür wurden Zellen gewählt, die sich in Aussehen und Größe ähnelten und ein DAPI-Signal, also eine Blaufärbung, aufwiesen. Die Proben wurden vor der Auswertung verblindet.

In den Tabelle 6, 7 und 8 sind Anzahl der Versuche pro Genotyp, Immunfluoreszenzfärbung, Bestrahlungsdosis und fixiertem Zeitpunkt aufgeführt.

Daneben wurde pro Patient und Färbung jeweils eine Probe keiner Bestrahlung ausgesetzt und als unbestrahlte Kontrolle ausgezählt.

ATM^{-/-}	0,25 h	2,5 h	5 h	8 h	24 h
γH2AX 1 Gy	16	16	16	14	16
γH2AX 2 Gy	11	12	12	12	14
53BP1 1 Gy	10	10	10	10	10
53BP1 2 Gy	8	9	10	13	13
ATM 1 Gy	3	3	3	3	3
ATM 2 Gy	3	2	3	3	3

Tabelle 6: Anzahl der Versuche der ATM-homozygoten Patienten (ATM^{-/-})

ATM^{+/-}	0,25 h	2,5 h	5 h	8 h	24 h
γH2AX 1 Gy	15	16	16	16	16
γH2AX 2 Gy	9	11	11	11	16
53BP1 1 Gy	13	13	13	13	13
53BP1 2 Gy	12	13	13	13	13
ATM 1 Gy	4	4	5	4	5
ATM 2 Gy	3	3	3	3	3

Tabelle 7: Anzahl der Versuche der ATM-heterozygoten Eltern (ATM^{+/-})

ATM^{+/+}	0,25 h	2,5 h	5 h	8 h	24 h
γH2AX 1 Gy	5	5	5	5	5
γH2AX 2 Gy	4	5	5	5	5
53BP1 1 Gy	4	5	5	5	5
53BP1 2 Gy	4	5	5	5	5
ATM 1 Gy	4	4	4	4	4
ATM 2 Gy	3	3	3	3	3

Tabelle 8: Anzahl der Versuche der gesunden Probanden (ATM^{+/+})

3.10 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Bei diesem Test werden die Mediane zweier Stichproben (A, B) miteinander verglichen. Die Stichprobenumfänge müssen nicht identisch sein und der Test setzt keine Normalverteilung voraus. Die Nullhypothese lautet hierbei: $H_0: \mu_1 = \mu_2$, wobei die Alternativhypothese alle Hypothesen außer der Nullhypothese zulässt (Weiß, 2010).

Der Test kann sowohl ein- als auch zweiseitig angewendet werden. Beim einseitigen Test wird untersucht, ob $A > B$ bzw. $B > A$ ist. Es wird also im Vorhinein die Richtung eines möglichen Unterschieds angenommen, während beim zweiseitigen Test nichts über die Richtung eines Unterschieds angegeben wird, also geprüft wird, ob $A = B$ ist (Weiß, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde je nach Fragestellung entweder der ein- oder der zweiseitige Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 5\%$ ($p \leq 0,05$) festgelegt.

Da Differenzen der Reparaturkapazitäten zwischen den verschiedenen Probandengruppen im Vorhinein angenommen wurden, wurde hier ein einseitiger Test durchgeführt. Es wurde geprüft inwieweit sich die Foci-Zahlen zwischen den ATM-Homozygoten und den ATM-Heterozygoten, den ATM-Homozygoten und den gesunden Individuen bzw. zwischen den ATM-Heterozygoten und den Gesunden unterscheiden.

Beim Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Färbungen untereinander (γ H2AX vs. 53BP1, γ H2AX vs. ATM und 53BP1 vs. ATM) wurde ein zweiseitiger Test angewandt, da hier vorab angenommen wurde, dass sich bei allen drei Färbungen vergleichbare Foci-Zahlen als Ausdruck der gemeinsamen Lokalisation aller drei Marker am DNA-Doppelstrangbruch nachweisen lassen würden.

Die statistische Analyse erfolgte mit OriginPro 8.5G. Die Diagramme wurden mit Microsoft Office Excel 2007 gezeichnet.

3.11 Verwendete Geräte und Materialien

3.11.1 Geräte

	Name	Hersteller
Autoklav	Systec 3870 ELV	Systec GmbH, Wetttenberg
Brutschrank	Heraeus, HeraCell	Kendro Laboratory Products, Hanau
Elektronische Pipettierhilfe	pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte
Fluoreszenz-Mikroskop	Nikon Eclipse E600	Nikon, Düsseldorf
Kamerasystem	Nikon DS 2MBWc (s/w) Nikon DS Fi1 (Farbe)	Nikon, Düsseldorf
Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf Research [®]	Eppendorf AG, Hamburg
Röntgenröhre	Philips PW2148/00	Philips, Hamburg
Sterilwerkbank	Heraeus Hera safe	Kendro Laboratory Products, Hanau
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY USA
Wärmebad		GFL, Burgwedel
Wipptisch	Shaker S4	ELMI, Riga, Lettland
Zentrifuge (für die Antikörperzentrifugation)	Biofuge 13 Heraeus	Kendro Laboratory Products, Osterode
Zentrifuge (für alle anderen Versuche)	Eppendorf Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 9: Verwendete Geräte

3.11.2 Verbrauchsmaterialien und Behälter

	Eigenname	Hersteller
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette, NH ₄ -Heparin	Sartstedt, Nümbrecht
Butterfly-Kanüle	Safety-Multifly [®] -Set	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen Ø12mm	Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dewargefäß	Isotherm	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Einfriersammelbox	5100 Cryo 1°C Freezing Container "Mr. Frosty"	Nalgene [®] Labware, Roskilde, Dänemark
Kryoröhrchen	Nunc Cryotube Vials	Nunc, Roskilde, Dänemark
Objektträger	SuperFrost	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Parafilm	Laboratory Film	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)		verschiedene Hersteller (VWR international, West Chester ,PA, USA; Sarstedt, Nümbrecht)
Zellkulturflasche 25 cm²	Nunclon Surface	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkultur-Petrischale 145/20 mm	Petrischalen	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zellkulturplatten	6 Well Cell Culture Plate Cellstar [®]	Greiner Bio-One, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zellsafer	Cellsafer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml		Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Behälter

3.11.3 Chemikalien

	Funktion	Hersteller
Aceton	Zellpermeabilisierung	SAV LP, Flintsbach
DMSO	Kulturmedium, Lymphozyten- kryokonservierung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Goatserum (NS)	Zellreinigung	PAA, Pasching, Österreich
LSM 1077 (Percoll)	Lymphozytenseparation	PAA, Pasching, Österreich
Methanol	Zellfixierung	VWR BDH Prolabo, Briare, Frankreich
Mounting Medium (Vectashield) <ul style="list-style-type: none"> • mit DAPI • ohne DAPI 	Minderung der Ausbleichung der immunhistochemischen Färbung <ul style="list-style-type: none"> • mit DAPI: Blaufärbung (DNA-bindender Farbstoff) 	Vector Laboratories, Burlingame, CA USA
PBS	Zellreinigung	Klinikapotheke
Propidiumiodid	Differenzierung der Zellzyklusphase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640	Kulturmedium	Biochrome AG, Berlin

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien

4. Ergebnisse

4.1 Mittlere Foci-Anzahl im zeitlichen Verlauf

Zur Untersuchung der DSB-Reparaturkapazität wurden zu definierten Zeitpunkten (0,25 h, 2,5 h, 5 h und 24 h) die γ H2AX-, 53BP1- bzw. ATM-Foci pro Lymphozyt der ATM-homozygoten Patienten ($ATM^{-/-}$), der ATM-heterozygoten Eltern ($ATM^{+/-}$) sowie der gesunden Probanden ($ATM^{+/+}$) gezählt. Dies erfolgte nach Bestrahlung mit 1 und 2 Gy. Außerdem wurden bei jedem Patienten die Lymphozyten-Foci einer unbestrahlten Blutprobe als Kontrolle ausgewertet. Pro Patientenprobe wurden mindestens 40 Zellen bzw. bei den unbestrahlten Proben mindestens 40 Foci ausgezählt.

Der erste Schwerpunkt der Arbeit lag auf dem Vergleich der mittleren Foci-Zahlen der verschiedenen Genotypen jeweils untereinander.

In Abbildung 5 und 6 ist die mittlere Zahl der γ H2AX-Foci abhängig von der Reparaturzeit bei den ATM-Homozygoten, ATM-Heterozygoten und gesunden Probanden nach Bestrahlung mit 1 Gy (Abbildung 5) bzw. 2 Gy (Abbildung 6) dargestellt. Die Anzahl der zugehörigen durchgeführten Experimente sind in den Tabellen 6, 7 und 8 aufgeführt.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich bei allen drei Patientenkollektiven eine Reduktion der DNA-Doppelstrangbrüche sichtbar an der abnehmenden Zahl der γ H2AX-Foci. Dabei stellte sich sowohl bei einer Bestrahlungsdosis von 1 Gy als auch von 2 Gy zwischen 0,25 h und 5 h ein starker Rückgang der DSB dar. Weniger stark ausgeprägt war dieser zwischen 5 h und 8 h und flachte sich bis zu 24 h noch weiter ab.

Die Mittelwerte nach Bestrahlung mit 1 Gy lagen dabei nach 0,25 h Reparaturzeit bei den ATM-Homozygoten und ATM-Heterozygoten zwischen 10 und 11 γ H2AX-Foci pro Lymphozyt ($ATM^{-/-}$ $\sim 10,55 \pm 0,17$ Foci/Zelle; $ATM^{+/-}$ $\sim 10,82 \pm 0,19$ Foci/Zelle) und bei den gesunden Probanden bei fast 10 Foci pro Lymphozyt ($ATM^{+/+}$ $\sim 9,83 \pm 0,19$). Nach einer Bestrahlungsdosis mit 2 Gy wiesen die Lymphozyten als Mittelwert pro Zelle zu diesem Zeitpunkt bei den $ATM^{-/-}$ $\sim 16,63 \pm 0,32$ Foci auf, bei den $ATM^{+/-}$ $\sim 16,05 \pm 0,62$ und bei den $ATM^{+/+}$ $\sim 15,69 \pm 0,26$.

Die Mittelwerte bei Fixierung nach 2,5 h lagen nach einer Bestrahlungsdosis mit 1 Gy bei allen drei Patientenkollektiven zwischen 5 und 6 Foci pro Zelle ($ATM^{-/-}$ $\sim 5,81 \pm 0,13$ Foci/Zelle; $ATM^{+/-}$ $\sim 5,65 \pm 0,25$ Foci/Zelle; $ATM^{+/+}$ $\sim 5,33 \pm 0,22$). Zum gleichen Zeitpunkt nach Bestrahlung mit 2 Gy lag die mittlere Foci-Anzahl bei den $ATM^{-/-}$ bei $\sim 10,62 \pm 0,20$ Foci pro Zelle, bei den $ATM^{+/-}$ bei $\sim 9,29 \pm 0,55$ und bei den $ATM^{+/+}$ bei $\sim 9,24 \pm 0,17$.

Deutlicher zeigten sich Unterschiede der Reparaturkapazität zu den späteren Fixierungszeitpunkten. Nach 5 h Reparaturzeit lagen die Mittelwerte für 1 Gy bei den ATM-Homozygoten bei $\sim 4,39 \pm 0,15$ Foci pro Zelle, bei den ATM-Heterozygoten bei $\sim 3,55 \pm 0,09$ und bei den gesunden Probanden bei $\sim 3,20 \pm 0,17$. Bei 2 Gy stellten sich bei den ATM^{-/-} $\sim 7,54 \pm 0,31$ Foci pro Zelle dar, dagegen bei den ATM^{+/-} $\sim 6,18 \pm 0,33$ und bei den ATM^{+/+} $\sim 5,59 \pm 0,39$.

Noch offensichtlicher wurden die Differenzen beim 8 h Fixierungszeitpunkt mit $\sim 3,56 \pm 0,15$ Foci/Zelle bei den ATM^{-/-} nach Bestrahlung mit 1 Gy und $\sim 6,52 \pm 0,25$ Foci/Zelle nach Bestrahlung mit 2 Gy. Die ATM^{+/-} hatten zu diesem Zeitpunkt $\sim 2,57 \pm 0,13$ Foci pro Zelle bei 1 Gy Bestrahlungsdosis und $\sim 4,94 \pm 0,32$ bei 2 Gy. Die ATM^{+/+} wiesen dagegen bei 1 Gy $\sim 2,26 \pm 0,07$ Foci pro Zelle auf und bei 2 Gy $\sim 3,94 \pm 0,50$.

Nach einer Reparaturzeit von 24 h ließen sich bei den die ATM-Homozygoten bei 1 Gy pro Zelle noch $\sim 2,99 \pm 0,18$ Foci auszählen, bei den ATM-Heterozygoten $\sim 1,51 \pm 0,14$ und bei den Gesunden nur noch $\sim 0,98 \pm 0,23$. Bei 2 Gy zeigten sich die Unterschiede der Reparaturkapazität noch ausgeprägter mit Differenzen von über 3 Foci pro Zelle zwischen den ATM-Homozygoten und den gesunden Probanden (ATM^{-/-} $\sim 5,57 \pm 0,22$ Foci/Zelle; ATM^{+/-} $\sim 2,94 \pm 0,26$ Foci/Zelle; ATM^{+/+} $\sim 2,28 \pm 0,22$).

Die statistische Auswertung mit einseitigem Mann-Whitney-U-Test ist in Tabelle 12 für die unbestrahlten und mit einer Dosis von 1 Gy bestrahlten Proben dargestellt sowie in Tabelle 13 für die Proben, die einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy ausgesetzt wurden. Dieser Test wurde angewandt, da Unterschiede der Foci-Zahlen zwischen den verschiedenen Probandengruppen vorab angenommen wurden.

Beim Vergleich der ATM-Homozygoten mit den ATM-Heterozygoten zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den unbestrahlten Kontrollzählungen sowie den Proben ab dem 5 h Fixierungszeitpunkt sowohl nach Bestrahlung mit 1 Gy als auch mit 2 Gy.

Beim Vergleich der ATM^{+/-} mit den ATM^{+/+} offenbarten sich signifikante Differenzen nur zwischen den unbestrahlten Kontrollzählungen und beim Fixierungszeitpunkt 0,25 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Zu allen anderen Reparaturzeitpunkten waren keine signifikanten Unterschiede ersichtlich, obgleich sich ab dem Fixierungszeitpunkt von 2,5 h eine erhöhte Foci-Anzahl bei den ATM-Heterozygoten beobachten ließ. Dieser leichte Unterschied wurde im weiteren zeitlichen Verlauf noch deutlicher.

Beim Vergleich der ATM-Homozygoten mit den gesunden Probanden ergaben sich abgesehen vom Fixierungszeitpunkt 0,25 h nach Bestrahlung mit 2 Gy zu allen Reparaturzeitpunkten signifikante Unterschiede der Foci-Anzahl.

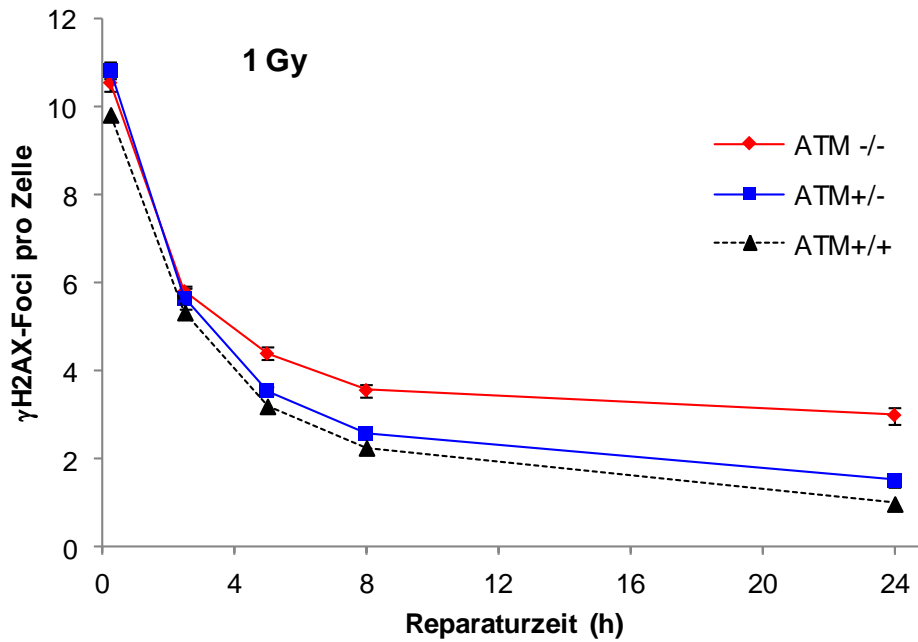


Abbildung 5: Darstellung der mittleren Foci-Anzahl in Abhängigkeit von der Reparaturzeit (0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy am Beispiel der γ H2AX-Färbung bei ATM-Homozygoten (ATM^{-/-}), ATM-Heterozygoten (ATM^{+/-}) und gesunden Probanden (ATM^{+/+}). Die Fehlerbalken stellen den zugehörigen Standardfehler dar.

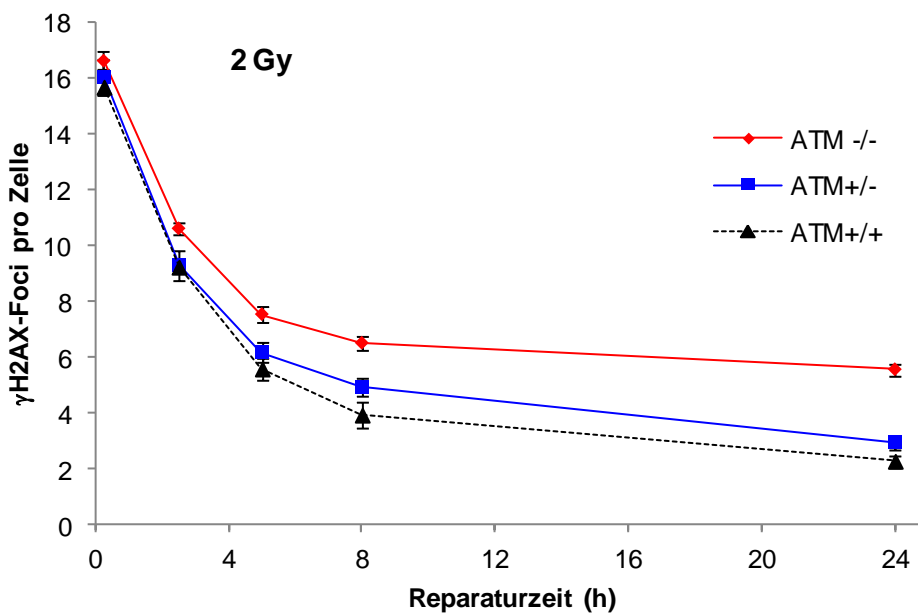


Abbildung 6: Darstellung der mittleren Foci-Anzahl in Abhängigkeit von der Reparaturzeit (0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 2 Gy am Beispiel der γ H2AX-Färbung bei ATM-Homozygoten (ATM^{-/-}), ATM-Heterozygoten (ATM^{+/-}) und gesunden Probanden (ATM^{+/+}). Die Fehlerbalken stellen den zugehörigen Standardfehler dar.

	unbestrahlte Kontrollen	1 Gy 0,25 h	1 Gy 2,5 h	1 Gy 5 h	1 Gy 8 h	1 Gy 24 h
ATM^{-/-} vs. ATM^{+/-}	0,0011	0,8658	0,0905	0,0001	0,0000	0,0000
ATM^{+/-} vs. ATM^{+/+}	0,0026	0,0092	0,4507	0,0633	0,1156	0,0633
ATM^{-/-} vs. ATM^{+/+}	0,0015	0,0215	0,0379	0,0010	0,0007	0,0006

Tabelle 12: Prüfung der Signifikanz mit einseitigem Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse der γ H2AX-Färbung von den verschiedenen Patientenkollektiven (ATM^{-/-}, ATM^{+/-}, ATM^{+/+}) der unbestrahlten Kontrollen und nach Bestrahlung mit 1 Gy wurden jeweils untereinander verglichen. Ergibt sich ein Wert von $p \leq 0,05$, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Patientengruppen.

	2 Gy 0,25 h	2 Gy 2,5 h	2 Gy 5 h	2 Gy 8 h	2 Gy 24 h
ATM^{-/-} vs. ATM^{+/-}	0,2470	0,0698	0,0097	0,0012	0,0000
ATM^{+/-} vs. ATM^{+/+}	0,1579	0,2483	0,1540	0,0350	0,1003
ATM^{-/-} vs. ATM^{+/+}	0,0665	0,0019	0,0049	0,0019	0,0007

Tabelle 13: Prüfung der Signifikanz mit einseitigem Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse der γ H2AX-Färbung von den verschiedenen Patientenkollektiven (ATM^{-/-}, ATM^{+/-}, ATM^{+/+}) nach Bestrahlung mit 2 Gy wurden jeweils untereinander verglichen. Ergibt sich ein Wert von $p \leq 0,05$, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Patientengruppen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich signifikante Differenzen der Foci-Anzahl zwischen den ATM^{-/-} und den ATM^{+/-} bzw. zwischen den ATM^{-/-} und den ATM^{+/+} zu den meisten Fixierungszeitpunkten nachweisen ließen. Beim Vergleich der Foci-Zahlen der ATM^{+/-} mit den ATM^{+/+} ergaben sich kaum signifikante Unterschiede, obgleich sich dennoch kleine Differenzen zeigten.

4.2 Prozentualer Anteil der Zellen, die Foci aufweisen im zeitlichen Verlauf

In Abbildung 7 und 8 ist in Abhängigkeit vom Reparaturzeitpunkt der prozentuale Anteil der Zellen, die überhaupt Foci aufwiesen, am Beispiel der 53BP1-Färbung nach Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 2 Gy dargestellt.

Hierbei stellten sich ebenfalls klare Unterschiede der verschiedenen Genotypen im zeitlichen Verlauf heraus.

Es war auffallend, dass nach einer Reparaturzeit von 0,25 h sowohl nach Bestrahlung mit 1 Gy als auch mit 2 Gy 100% aller Zellen in allen drei Patientenkollektiven Foci, demzufolge DNA-Doppelstrangbrüche aufgrund der kurz vorher erfolgten Bestrahlung aufwiesen.

Am Fixierungszeitpunkt von 24 h offenbarten sich hingegen merkliche Differenzen zwischen den einzelnen Genotypen. Während bei den $ATM^{-/-}$ nach Bestrahlung mit 1 Gy noch $\sim 91,99 \pm 1,67\%$ der Zellen Foci aufwiesen, waren es bei den $ATM^{+/-}$ nur noch $\sim 75,09 \pm 2,53$ und bei den $ATM^{+/+}$ $\sim 69,92 \pm 7,91$.

Noch stärker variierten die Prozentangaben nach Bestrahlung mit 2 Gy am 24 h Fixierungszeitpunkt, da hier sogar 100% der Lymphozyten der $ATM^{-/-}$ Foci darboten, während es bei den $ATM^{+/-}$ $\sim 90,42 \pm 0,98\%$ und bei den $ATM^{+/+}$ nur noch $\sim 85,73 \pm 3,37\%$ waren.

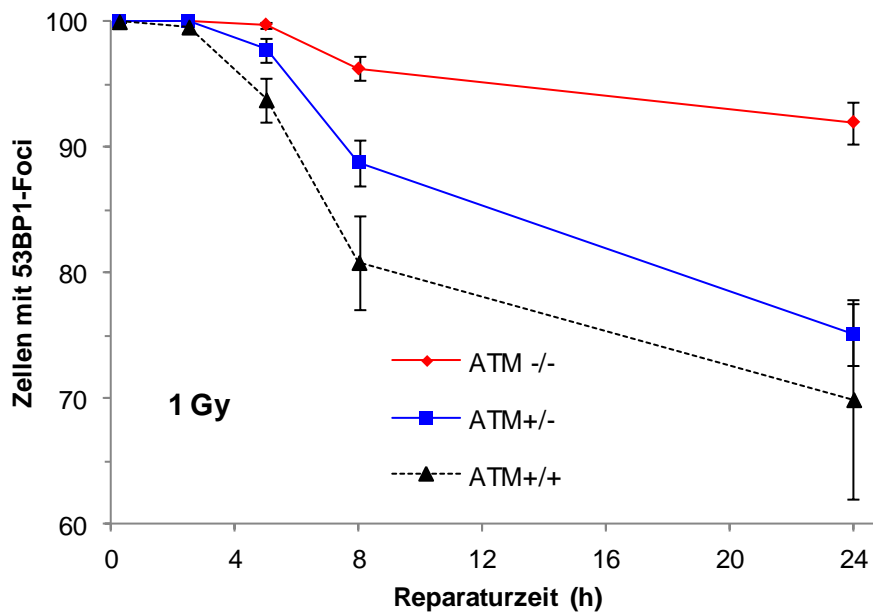


Abbildung 7: Prozentualer Anteil der Zellen, die 53BP1-Foci aufweisen in Abhängigkeit von der Reparaturzeit (0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy bei ATM-Homozygoten (ATM^{-/-}), ATM-Heterozygoten (ATM^{+/-}) und gesunden Probanden (ATM^{+/+}). Die Fehlerbalken stellen den zugehörigen Standardfehler dar.

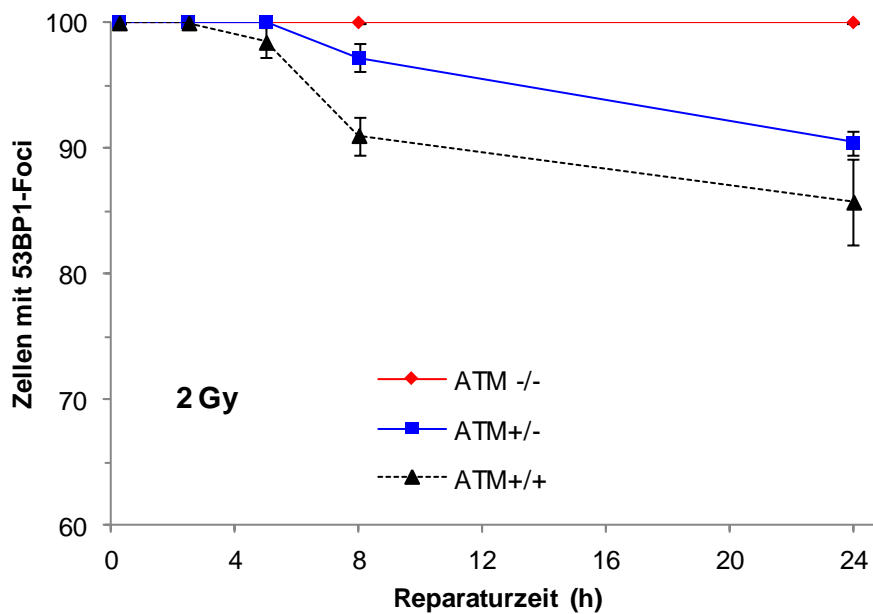


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der Zellen, die 53BP1-Foci aufweisen in Abhängigkeit von der Reparaturzeit (0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 2 Gy bei ATM-Homozygoten (ATM^{-/-}), ATM-Heterozygoten (ATM^{+/-}) und gesunden Probanden (ATM^{+/+}). Die Fehlerbalken stellen den zugehörigen Standardfehler dar.

4.3 Vergleich der Immunfluoreszenzfärbungen untereinander

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf dem Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen untereinander. Dies erfolgte gesondert für jedes Patientenkollektiv.

In den Abbildungen 9 und 10 ist die durchschnittliche Foci-Anzahl, die bei der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) ermittelt wurde, in Abhängigkeit von der Reparaturzeit (0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy (Abb.9) bzw. 2 Gy (Abb.10) bei den ATM-Homozygoten ($ATM^{-/-}$) dargestellt. In gleicher Weise erfolgt die Darstellung für die ATM-Heterozygoten ($ATM^{+/-}$) in Abbildung 11 nach Bestrahlung mit 1 Gy und in Abbildung 12 nach Bestrahlung mit 2 Gy sowie für die gesunden Probanden ($ATM^{+/+}$) in Abbildung 13 (1 Gy) und Abbildung 14 (2 Gy).

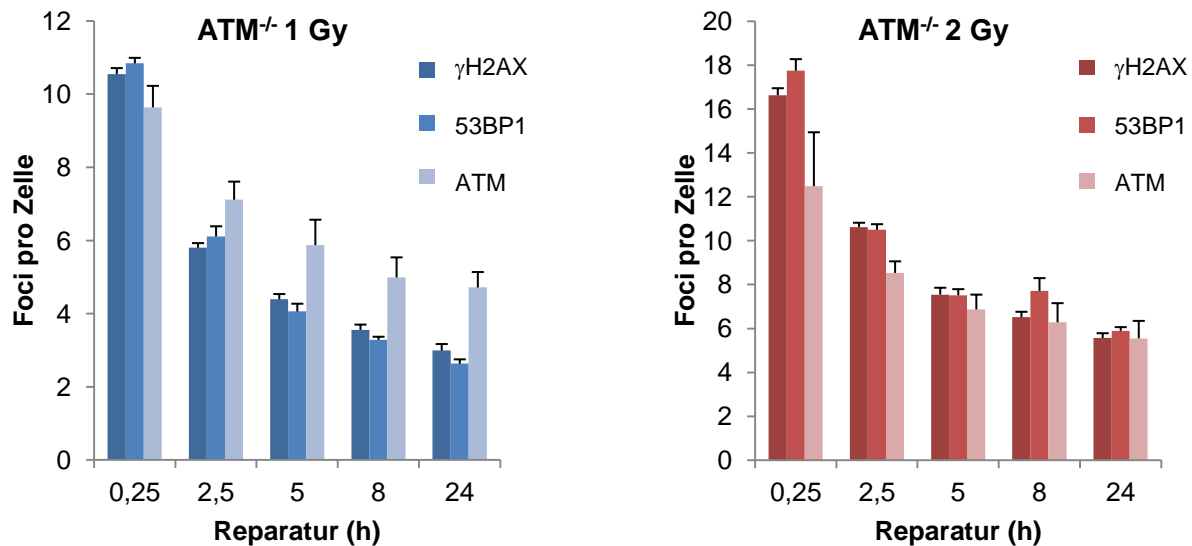
Die statistische Auswertung erfolgte mit zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test, da hier im Vorhinein davon ausgegangen wurde, dass sich bei allen drei Färbungen vergleichbare Foci-Zahlen nachweisen lassen würden. Ergibt sich dabei ein Wert von $p > 0,05$ besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Foci-Anzahl der verschiedenen Färbungen.

Beim Vergleich der γ H2AX-Färbung mit der 53BP1-Färbung zeigten sich bis auf wenige Ausnahmen keine signifikanten Diskrepanzen bei allen drei Probandengruppen.

Die Gegenüberstellung der γ H2AX- und der ATM-Färbung ergab bei den ATM-Homozygoten nach Bestrahlung mit 1 Gy zu mehreren Zeitpunkten signifikante Werte, nämlich beim 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h Fixierungszeitpunkt sowie nach Bestrahlung mit 2 Gy am 2,5 h Reparaturzeitpunkt. Bei den ATM-Heterozygoten und den Gesunden zeigten sich mit Ausnahme der unbestrahlten Kontrolle keine signifikanten Unterschiede.

Beim Vergleich der 53BP1- und der ATM-Färbungen ergaben sich bei den $ATM^{-/-}$ und den $ATM^{+/-}$ zu späteren Reparaturzeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy signifikante Unterschiede, sowie bei der unbestrahlten Kontrolle von $ATM^{+/-}$. Bei 2 Gy ergaben sich keine signifikanten Werte. Bei den $ATM^{+/+}$ zeigten sich hier zu keinem Fixierungszeitpunkt signifikante Diskrepanzen zwischen den Färbungen.

Die Tabellen 20 bis 22 zeigen in der Übersicht die bei den drei Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten Foci-Mittelwerte und Standardabweichungen (SE) zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten bei den ATM-Homozygoten (Tabelle 20), bei den ATM-Heterozygoten (Tabelle 21) und den gesunden Probanden (Tabelle 22).



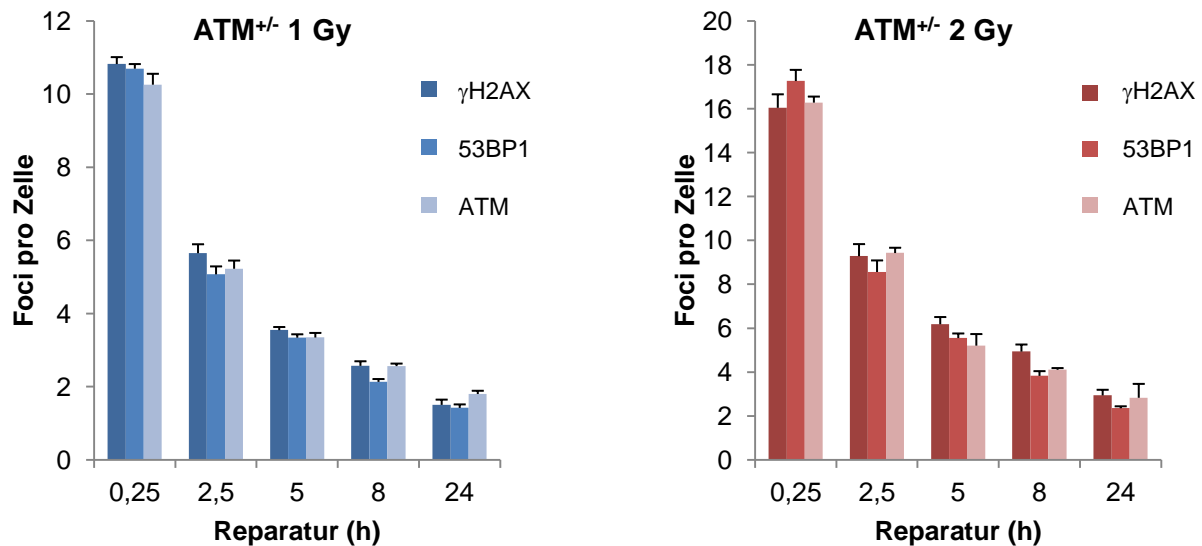
Abbildungen 9 und 10: Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit (0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy (Abb.9) bzw. 2 Gy (Abb.10) bei den ATM-Homozygoten (ATM^{-/-}). Die Fehlerbalken stellen den zugehörigen Standardfehler dar.

ATM ^{-/-}	unbestrahlte Kontrollen	1 Gy 0,25 h	1 Gy 2,5 h	1 Gy 5 h	1 Gy 8 h	1 Gy 24 h
γ H2AX vs. 53BP1	0,0630	0,3166	0,4768	0,2155	0,3055	0,2155
γ H2AX vs. ATM	0,0579	0,1312	0,0162	0,0386	0,0198	0,0162
53BP1 vs. ATM	0,5541	0,0759	0,1508	0,0346	0,0143	0,0143

Tabelle 14: Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test. Es wurden die Ergebnisse der ATM-Homozygoten (ATM^{-/-}) bei den verschiedenen Färbungen (γ H2AX-, 53BP1-, ATM-Färbung) der unbestrahlten Kontrollen und nach Bestrahlung mit 1 Gy jeweils untereinander verglichen. Ergibt sich ein Wert von $p > 0,05$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Foci-Anzahl der verschiedenen Färbungen.

ATM ^{-/-}	2 Gy 0,25 h	2 Gy 2,5 h	2 Gy 5 h	2 Gy 8 h	2 Gy 24 h
γ H2AX vs. 53BP1	0,0268	0,9717	0,9212	0,3143	0,2541
γ H2AX vs. ATM	0,2124	0,0358	0,3481	1,0000	1,0000
53BP1 vs. ATM	0,0525	0,0771	0,2712	0,2260	0,4196

Tabelle 15: Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test. Es wurden die Ergebnisse der ATM-Homozygoten (ATM^{-/-}) bei den verschiedenen Färbungen (γ H2AX-, 53BP1-, ATM-Färbung) nach Bestrahlung mit 2 Gy jeweils untereinander verglichen. Ergibt sich ein Wert von $p > 0,05$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Foci-Anzahl der verschiedenen Färbungen.



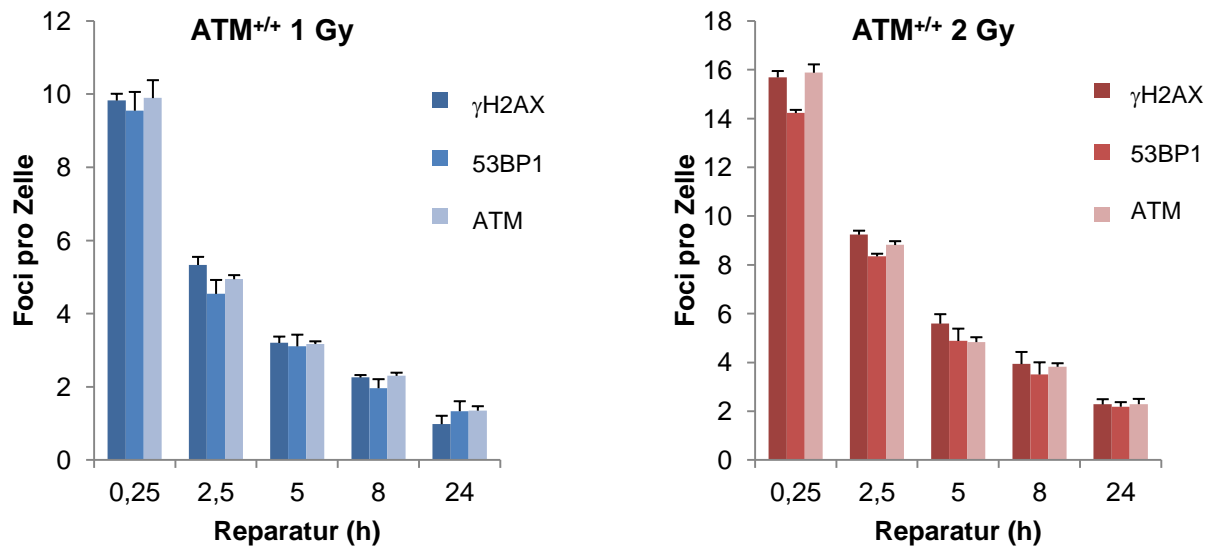
Abbildungen 11 und 12: Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit (0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy (**Abb.11**) bzw. 2 Gy (**Abb.12**) bei den ATM-Heterozygoten (ATM^{+/-}). Die Fehlerbalken stellen den zugehörigen Standardfehler dar.

ATM ^{+/-}	unbestrahlte Kontrollen	1 Gy 0,25 h	1 Gy 2,5 h	1 Gy 5 h	1 Gy 8 h	1 Gy 24 h
γ H2AX vs. 53BP1	0,0113	0,6124	0,2635	0,1094	0,0159	0,7756
γ H2AX vs. ATM	0,0045	0,2113	0,5391	0,1504	0,7409	0,1485
53BP1 vs. ATM	0,0178	0,3958	0,8651	0,8953	0,0149	0,0265

Tabelle 16: Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test. Es wurden die Ergebnisse der ATM-Heterozygoten (ATM^{+/-}) bei den verschiedenen Färbungen (γ H2AX-, 53BP1-, ATM-Färbung) der unbestrahlten Kontrollen und nach Bestrahlung mit 1 Gy jeweils untereinander verglichen. Ergibt sich ein Wert von $p > 0,05$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Foci-Anzahl der verschiedenen Färbungen.

ATM ^{+/-}	2 Gy 0,25 h	2 Gy 2,5 h	2 Gy 5 h	2 Gy 8 h	2 Gy 24 h
γ H2AX vs. 53BP1	0,1886	0,2837	0,1048	0,0175	0,2278
γ H2AX vs. ATM	1,0000	0,6404	0,1195	0,1611	0,6033
53BP1 vs. ATM	0,2199	0,4196	0,8930	0,2818	0,7771

Tabelle 17: Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test. Es wurden die Ergebnisse der ATM-Heterozygoten (ATM^{+/-}) bei den verschiedenen Färbungen (γ H2AX-, 53BP1-, ATM-Färbung) nach Bestrahlung mit 2 Gy jeweils untereinander verglichen. Ergibt sich ein Wert von $p > 0,05$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Foci-Anzahl der verschiedenen Färbungen.



Abbildungen 13 und 14: Darstellung der mittleren Foci-Anzahl der jeweiligen Färbung (γ H2AX, 53BP1, ATM) in Abhängigkeit von der Reparaturzeit (0,25 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h) nach Bestrahlung mit 1 Gy (**Abb.13**) bzw. 2 Gy (**Abb.14**) bei den gesunden Probanden (ATM^{+/+}). Die Fehlerbalken stellen den zugehörigen Standardfehler dar.

ATM ^{+/+}	unbestrahlte Kontrollen	1 Gy 0,25 h	1 Gy 2,5 h	1 Gy 5 h	1 Gy 8 h	1 Gy 24 h
γ H2AX vs. 53BP1	0,0601	0,9025	0,0947	0,8345	0,5309	0,2963
γ H2AX vs. ATM	0,0200	0,2703	0,2703	0,9025	0,9025	0,2703
53BP1 vs. ATM	0,7133	0,6650	0,7133	0,7133	0,5403	0,9025

Tabelle 18: Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test. Es wurden die Ergebnisse der gesunden Probanden (ATM^{+/+}) bei den verschiedenen Färbungen (γ H2AX-, 53BP1-, ATM-Färbung) der unbestrahlten Kontrollen und nach Bestrahlung mit 1 Gy jeweils untereinander verglichen. Ergibt sich ein Wert von $p > 0,05$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Foci-Anzahl der verschiedenen Färbungen.

ATM ^{+/+}	2 Gy 0,25 h	2 Gy 2,5 h	2 Gy 5 h	2 Gy 8 h	2 Gy 24 h
γ H2AX vs. 53BP1	0,0304	0,0122	0,2101	0,5309	0,8345
γ H2AX vs. ATM	0,3768	0,1360	0,2330	0,7656	1,0000
53BP1 vs. ATM	0,0518	0,0736	1,0000	0,7656	0,7656

Tabelle 19: Prüfung der Signifikanz mit zweiseitigem Mann-Whitney-Test. Es wurden die Ergebnisse der gesunden Probanden (ATM^{+/+}) bei den verschiedenen Färbungen (γ H2AX-, 53BP1-, ATM-Färbung) nach Bestrahlung mit 2 Gy jeweils untereinander verglichen. Ergibt sich ein Wert von $p > 0,05$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Foci-Anzahl der verschiedenen Färbungen.

In Abbildung 15 sieht man Aufnahmen von Immunfluoreszenzdoppelfärbungen der Lymphozyten von ATM-Homozygoten ($ATM^{-/-}$), ATM-Heterozygoten ($ATM^{+/-}$) und gesunden Probanden ($ATM^{+/+}$) nach Bestrahlung mit 2 Gy und Fixierung nach 8 h. Die γ H2AX-Färbung leuchtet grün, die 53BP1-Färbung rot. DAPI färbt als DNA-bindender Farbstoff Zellkerne an und führt zu einer Blaufärbung. Bei den zusammengeführten Bildern zeigt sich die Kollokalisierung von γ H2AX und 53BP1 am DNA-Doppelstrangbruch als Gelbfärbung. Die Kollokalisierung an gleicher Stelle soll hierbei demonstrieren, dass die Foci wirklich DSB sichtbar machen.

Zu erkennen ist, dass sich die Anzahl der Foci abhängig vom jeweiligen Genotyp unterscheidet.

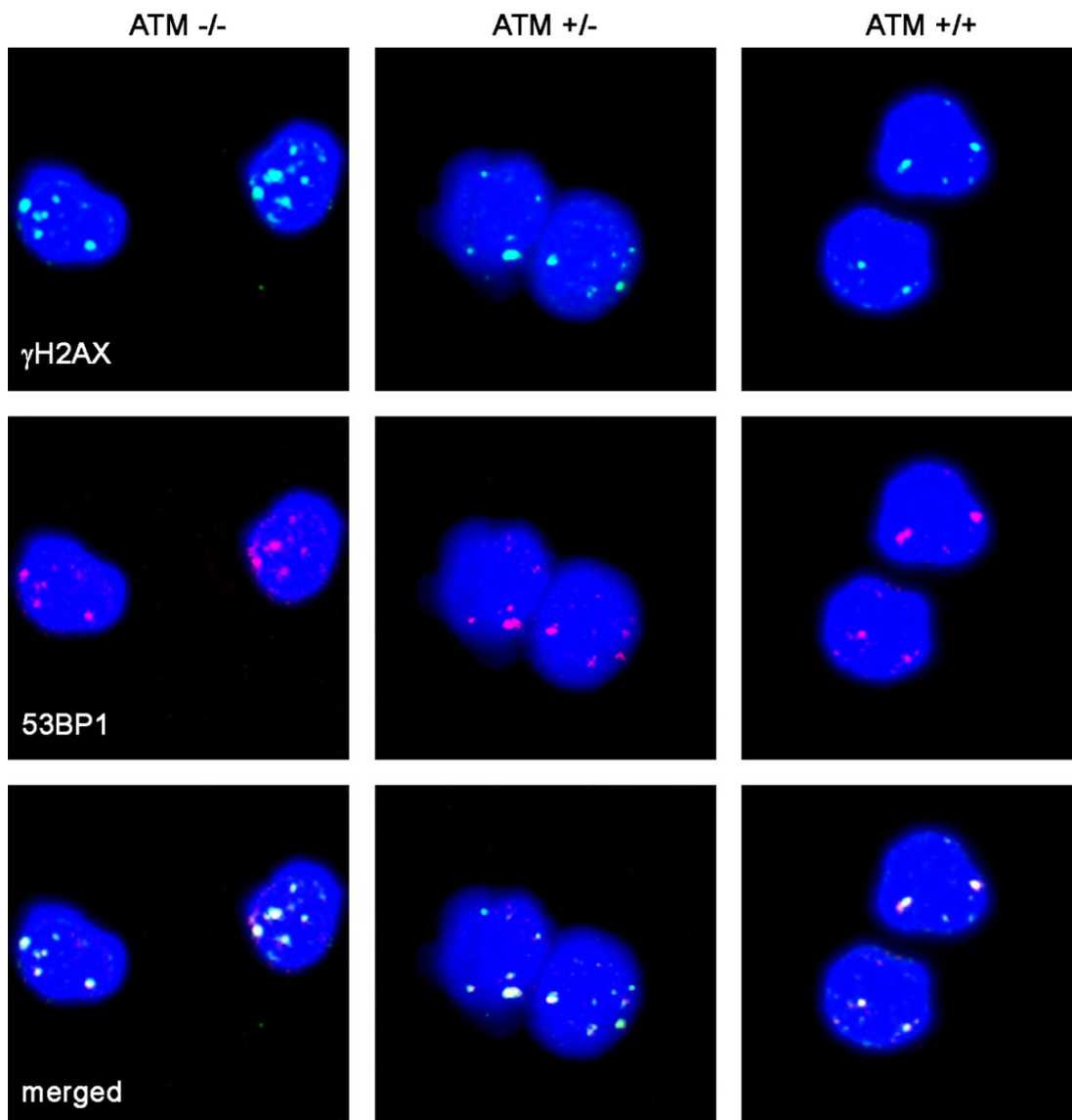


Abbildung 15: Immunfluoreszenzdoppelfärbung der DNA-Doppelstrangbrüche in Lymphozyten von ATM-Homozygoten ($ATM^{-/-}$), ATM-Heterozygoten ($ATM^{+/-}$) und gesunden Probanden ($ATM^{+/+}$) nach Bestrahlung mit 2 Gy und Fixierung nach 8 h in 600facher Vergrößerung (aus Rube *et al.*, 2010)

ATM ^{-/-}	γ H2AX-Färbung		53BP1-Färbung		ATM-Färbung	
	Mittelwert	SE	Mittelwert	SE	Mittelwert	SE
Kontrolle	0,23	0,02	0,29	0,03	0,32	0,03
1 Gy 0,25 h	10,55	0,17	10,84	0,15	9,64	0,59
2,5 h	5,81	0,13	6,11	0,28	7,12	0,50
5 h	4,39	0,15	4,06	0,22	5,88	0,69
8 h	3,56	0,15	3,29	0,09	4,99	0,55
24 h	2,99	0,18	2,63	0,12	4,72	0,42
2 Gy 0,25 h	16,63	0,32	17,75	0,53	12,49	2,46
2,5 h	10,62	0,20	10,50	0,25	8,53	0,53
5 h	7,54	0,31	7,51	0,28	6,87	0,68
8 h	6,52	0,25	7,71	0,59	6,28	0,87
24 h	5,57	0,22	5,89	0,17	5,55	0,80

Tabelle 20: Darstellung der bei den drei Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten Foci-Mittelwerte und Standardabweichungen (SE) zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten bei den ATM^{-/-}

ATM ^{+/-}	γ H2AX-Färbung		53BP1-Färbung		ATM-Färbung	
	Mittelwert	SE	Mittelwert	SE	Mittelwert	SE
Kontrolle	0,15	0,01	0,19	0,01	0,27	0,03
1 Gy 0,25 h	10,82	0,19	10,70	0,13	10,26	0,30
2,5 h	5,65	0,25	5,08	0,22	5,23	0,22
5 h	3,55	0,09	3,34	0,09	3,35	0,12
8 h	2,57	0,13	2,13	0,08	2,57	0,07
24 h	1,51	0,14	1,42	0,10	1,80	0,09
2 Gy 0,25 h	16,05	0,62	17,27	0,51	16,28	0,28
2,5 h	9,29	0,55	8,57	0,53	9,43	0,24
5 h	6,18	0,33	5,56	0,21	5,21	0,53
8 h	4,94	0,32	3,83	0,22	4,11	0,08
24 h	2,94	0,26	2,36	0,09	2,83	0,63

Tabelle 21: Darstellung der bei den drei Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten Foci-Mittelwerte und Standardabweichungen (SE) zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten bei den ATM^{+/-}

ATM ^{+/+}	γ H2AX-Färbung		53BP1-Färbung		ATM-Färbung	
	Mittelwert	SE	Mittelwert	SE	Mittelwert	SE
Kontrolle	0,09	0,01	0,17	0,04	0,16	0,00
1 Gy 0,25 h	9,83	0,19	9,55	0,51	9,90	0,49
2,5 h	5,33	0,22	4,54	0,38	4,94	0,11
5 h	3,20	0,17	3,11	0,32	3,17	0,08
8 h	2,26	0,07	1,96	0,25	2,30	0,09
24 h	0,98	0,23	1,34	0,27	1,35	0,12
2 Gy 0,25 h	15,69	0,26	14,23	0,13	15,88	0,34
2,5 h	9,24	0,17	8,35	0,11	8,82	0,16
5 h	5,59	0,39	4,88	0,51	4,84	0,20
8 h	3,94	0,50	3,51	0,50	3,83	0,15
24 h	2,28	0,22	2,19	0,19	2,29	0,22

Tabelle 22: Darstellung der bei den drei Immunfluoreszenzfärbungen ermittelten Foci-Mittelwerte und Standardabweichungen (SE) zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten bei den ATM^{+/+}

5. Diskussion

5.1 Betrachtungen der Methodik

5.1.1 Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung

Wie im Unterkapitel 2.3.3 beschrieben stellt die γ H2AX-Färbung eine mögliche Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch ionisierende Strahlen verursacht wurden, dar. Dass die γ H2AX-Foci-Analyse zur Detektion von DSB geeignet ist, konnte zum einen dadurch gezeigt werden, dass eine enge Korrelation zwischen DNA-Schäden, die durch ^{125}I UD verursacht wurden und der γ -H2AX-Foci-Bildung besteht (Sedelnikova *et al.*, 2002). Zum anderen lassen sich bei der Bestimmung der DSB-Induktion und Reparatur mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) bei höheren Dosen (zwischen 10 und 80 Gy) und der γ H2AX-Foci-Bildung und Wiederauflösung quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen (Rothkamm und Löbrich, 2003).

Die Foci-Bildung setzt innerhalb von Sekunden nach Bestrahlung ein (Rogakou *et al.*, 1998). Zwar ist ihr Maximum bereits nach 3 Minuten erreicht, aber die Foci sind zu diesem Zeitpunkt noch sehr klein, so dass eine zuverlässigere Auszählung erst ab 15 Minuten nach Bestrahlung möglich ist (Löbrich *et al.*, 2010).

Mittels der γ H2AX-Methode ist der DSB-Nachweis ab Bestrahlungsdosen von 0,001 Gy möglich und dies entspricht Dosen, die in diagnostischen sowie therapeutischen Bereichen liegen (Rothkamm und Löbrich, 2003). Das stellt einen entscheidenden Vorteil zur PFGE dar, die den Nachweis von DNA-DSB erst in wesentlichen höheren Bestrahlungsdosen ermöglicht. Die höheren Dosen können im zeitlichen Verlauf zur Apoptose führen und so eine Bestimmung der Reparaturkapazität zu späteren Fixierungszeitpunkten mitunter nicht mehr ermöglichen (Löbrich *et al.*, 2010). Die erhöhte Apoptoserate kann insbesondere bei Patienten mit Ataxia teleangiectasia von Bedeutung sein und womöglich die absolute DSB-Anzahl verändern (Foray *et al.*, 1997). Daher scheint gerade hierbei die Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX aufgrund der Anwendung geringerer Bestrahlungsdosen ein sensitives Verfahren zum Nachweis subtiler DSB-Reparaturdefekte zu sein (Löbrich *et al.*, 2010).

Ein weiterer Vorteil der Immunfluoreszenzmikroskopie von bestrahlten Lymphozyten besteht darin, dass es sich um einen Screeningtest handelt, der mit etwas Übung eine relativ rasche Auswertung von Patientenproben ermöglicht und so eine schnelle Einschätzung der Reparaturfähigkeit verschiedener Patientenkollektive erfolgen kann (Redon *et al.*, 2009).

Weiterhin von Vorteil bei diesem Verfahren ist, dass eine nicht so große Anzahl von Zellen benötigt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgelegt, dass ≥ 40 Lymphozyten zu den jeweiligen Fixierungszeitpunkten auszuzählen sind. Bei den unbestrahlten Kontrollzählungen wurden so viele Zellen ausgewertet bis insgesamt eine Summe von ≥ 40 Foci erreicht wurde. Die Summe der zu zählenden Zellen lag im dreistelligen Bereich. Bei der Analyse mittels PFGE werden dagegen 10^5 bis 10^6 Zellen zu Auswertung benötigt (Löbrich *et al.*, 2010).

Gewiss gibt es auch Nachteile der γ H2AX-Methode. Die Phosphorylierung von H2AX wird nicht ausschließlich durch DNA-Doppelstrangbrüche, die als Folge ionisierender Strahlen entstanden sind, initiiert. DSB, die durch Hydroxyurea, einem Medikament der Leukämietherapie, ausgelöst werden, führen auch zur Entstehung von γ H2AX (Ward und Chen, 2001). Während verschiedener physiologischer Prozesse kommt es ebenfalls zur Phosphorylierung von H2AX wie zum Beispiel bei der Apoptose und bei der V(D)J-Rekombination im Rahmen der Immunantwort (Redon *et al.*, 2002). Des Weiteren induzieren einzelsträngige DNA-Bereiche in Replikationsgabeln ATR-vermittelt die Entstehung von γ H2AX-Foci (Ward *et al.*, 2004). Die bisher genannten Nachteile können aber insofern vernachlässigt werden, da sie rein von der Wahrscheinlichkeit her jede Probe gleichermaßen betreffen und eher die Relationen der Foci-Zahlen der verschiedenen Patienten zueinander eruiert werden als die absoluten Foci-Zahlen. Außerdem zeigen sich abhängig von der Person, die die Proben auswertet, ohnehin leichte Variationen der Ergebnisse.

Bei Bestrahlungsdosen ab 2 Gy wurden Überlagerungen von Foci-Signalen beschrieben, weshalb sich möglicherweise weniger Foci auszählen lassen, als tatsächlich vorhanden sind (Rogakou *et al.*, 1999).

Eine weitere Einschränkung dieser Methode ist, dass nur DSB quantifiziert werden, die mittels NHEJ repariert werden. Dies stellt den vorherrschenden Reparaturweg in Säugetierzellen dar.

Außerdem ist anzumerken, dass γ H2AX nicht den tatsächlichen DSB-Zustand erfasst, sondern Chromatinmodifikationen während der DSB-Reparatur widerspiegelt (Rübe *et al.*, 2010; Kinner *et al.*, 2008; Costes *et al.*, 2010). Dies wird beispielsweise daran deutlich, dass die vollkommene Foci-Entwicklung eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, obgleich die DNA-Doppelstrangbrüche direkt als Reaktion auf die Bestrahlung entstehen (Kinner *et al.*, 2008). Eine genauere Methode ist hierbei die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) mit der durch Immunogold-Markierung von phosphoryliertem Ku70 eine Darstellung des aktuellen DSB-Status möglich wird (Rübe *et al.*, 2011). Ku70 stellt ein zentrales Protein des Reparaturwegs durch NHEJ dar, das in Form eines Ku70/80 Heterodimer an die

Doppelstrangbrüchen bindet, diese beieinander hält und die DNA-Reparatur erleichtert (Cary *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 2001). Mit dieser TEM-Methode wird die Entstehung und die Reparatur der DSB unmittelbar erfasst (Rübe *et al.*, 2011).

Insgesamt kann dennoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei der γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie um ein sensitives Verfahren für den quantitativen Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen handelt (Löbrich *et al.*, 2010). Dies betrifft insbesondere niedrige Bestrahlungsdosen bis 2 Gy, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden. Das Verhältnis zwischen den DNA-DSB und den γ H2AX-Foci liegt nahe bei 1:1 (Sedelnikova *et al.*, 2002).

5.1.2 Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der 53BP1-Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung von 53BP1 wurde durchgeführt, um zu bestätigen, dass die γ H2AX-Foci-Analyse tatsächlich zur Quantifizierung der DSB geeignet ist.

Die Kolokalisation der 53BP1- und γ H2AX-Foci wurde mehrfach in der Literatur beschrieben und sowohl die Induktion als auch das Auflösen der Foci folgen einer sehr ähnlichen Kinetik (Schultz *et al.*, 2000; Rappold *et al.*, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002, Kao *et al.*, 2003).

5.1.3 Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der ATM-Immunfluoreszenzfärbung

Zusätzlich wurde die Immunfluoreszenzfärbung von ATM durchgeführt, um einerseits zu überprüfen, ob sich mit der γ H2AX- und 53BP1-Foci-Analyse vergleichbare Ergebnisse ergeben, wodurch sich die Eignung dieser beiden Methoden wiederum bestärken ließe und um andererseits zu klären, inwiefern die ATM-Foci-Analyse ebenfalls zur Quantifizierung von DNA-DSB geeignet ist.

Suzuki *et al.* untersuchten die Kolokalisation der γ H2AX- und ATM-Foci in humanen Zellen nach Bestrahlung im Niedrigdosisbereich (Suzuki *et al.*, 2006). Sie stellten fest, dass ATM- und γ H2AX-Foci sowohl in bestrahlten als auch zumeist in unbestrahlten Zellen kolokalisiert sind. Weiterhin zeigten sie auf, dass in wachsenden Zellen phosphoryliertes ATM ein geeigneterer DSB-Marker ist, da weniger spontane Phosphorylierungen von ATM als γ H2AX auftreten. Dar *et al.* und Sato *et al.* erfassten ebenfalls eine Kolokalisierung von phosphoryliertem ATM und γ H2AX (Dar *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2010).

Auch die Kollokalisierung von ATM- und 53BP1-Foci wurde in der Literatur aufgeführt (Su *et al.*, 2010). Suzuki *et al.* beschrieben die Kollokalisierung von phosphorylierten H2AX-, ATM- und 53BP1-Foci (Suzuki *et al.*, 2010).

5.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

5.2.1 Vergleich der Reparaturkapazität

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Reparaturkapazität der ATM-Homozygoten, der ATM-Heterozygoten und der gesunden Menschen zu den verschiedenen Fixierungszeitpunkten jeweils untereinander verglichen.

5.2.1.1 Vergleich der ATM-Homozygoten und Heterozygoten

Der Vergleich der Ergebnisse der γ H2AX-Färbung der ATM^{-/-} mit den ATM^{+/-} offenbarte signifikante Differenzen der Reparaturkapazität ab dem 5 h Fixierungszeitpunkt nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy.

Vergleichbare Foci-Zahlen wurden in der Literatur beschrieben (Rübe *et al.*, 2010). Rübe *et al.* untersuchten die Reparaturkapazität der Lymphozyten von 4 ATM^{-/-} und 5 ATM^{+/-} und ermittelten beispielsweise bei den ATM-Homozygoten am 24 h Fixierungszeitpunkt nach Bestrahlung mit 1 Gy $\sim 3,2 \pm 0,1$ Foci pro Zelle sowie nach Bestrahlung mit 2 Gy $\sim 6,4 \pm 0,7$ Foci pro Zelle. In dieser Arbeit ergaben sich zu diesem Fixierungszeitpunkt nach Bestrahlung mit 1 Gy $\sim 3,0 \pm 0,1$ Foci/Zelle sowie bei 2 Gy $\sim 5,6 \pm 0,2$ Foci/Zelle.

Die verlängerte Persistenz einer erhöhten Anzahl unreparierter DSB bei ATM-Homozygoten im Vergleich zu ATM-Heterozygoten und gesunden Menschen wurden auch in der Literatur beschrieben (Kato *et al.*, 2006). Allerdings beschrieben Kato *et al.* eine verlangsamte Entstehung der γ H2AX-Foci und ein verspätetes Maximum nach Bestrahlung von humanen ATM^{-/-}-Fibroblasten. In dieser Arbeit konnten zu den früheren Fixierungszeitpunkten von 0,25 h und 5 h keine signifikanten Unterschiede der Foci-Zahlen zwischen den ATM-Homozygoten und den ATM-Heterozygoten festgestellt werden und die maximale Foci-Zahl wurde auch bei den ATM^{-/-} bereits zu Beginn erreicht. Scheinbar reagieren ATM^{-/-}-Fibroblasten im Vergleich zu Lymphozyten verzögert auf ionisierende Strahlen.

Zusammenfassend kann man die Unterschiede der γ H2AX-Foci-Zahlen zu späteren Fixierungszeitpunkten als Zeichen einer verminderten Fähigkeit zur DSB-Reparatur der an Ataxia teleangiectasia erkrankten Kinder im Vergleich zu den Eltern deuten. Die Persistenz der DSB könnte Ausdruck einer gesteigerten Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen

sein. Dies steht auch im Einklang mit Ergebnissen von Kühne *et al.*, dass ATM-defiziente Zellen die Mehrheit der DSB zwar in der gleichen Zeit wie gesunde Zellen reparieren, jedoch ein Teil der DSB über längere Zeit unrepariert bleibt und dies als Hinweis auf eine erhöhte Radiosensitivität gedeutet wurde (Kühne *et al.*, 2004). Vergleichbare Resultate wurden auch von Löbrich und Jeggo ermittelt, die nach Bestrahlung von ATM^{-/-}-Fibroblasten zeigen konnten, dass etwa 10% der entstandenen DSB über längere Zeit nicht repariert wurden (Löbrich und Jeggo, 2005).

5.2.1.2 Vergleich der ATM-Heterozygoten und Gesunden

Beim Vergleich der ATM^{+/-} mit den ATM^{+/+} zeigten sich bis auf wenige Ausnahmen keine signifikanten Unterschiede. Dennoch konnte im zeitlichen Verlauf eine etwas erhöhte Persistenz von DSB bei den ATM-Heterozygoten offenbart werden, die zu späteren Fixierungszeitpunkten immer deutlicher wurde. Dies kann als eine etwas verringerte Fähigkeit der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen gedeutet werden.

In der Literatur wurden allerdings signifikante Unterschiede der Foci-Anzahl zwischen humanen Lymphozyten von ATM-Heterozygoten und Gesunden beschrieben mit Differenzen von etwa einem Focus nach Bestrahlung mit 1 Gy sowie 2 Foci nach Bestrahlung mit 2 Gy (Rübe *et al.*, 2010). Dass sich in dieser Arbeit weniger starke Diskrepanzen der Foci-Anzahl zeigten, könnte als Hinweis darauf interpretiert werden, dass möglicherweise die Mehrzahl der getesteten heterozygoten Individuen ATM-Mutationen aufweist, die sich nicht allzu stark auf die DSB-Reparaturkapazität auswirken.

Kato *et al.* verglichen in einer Studie die DNA-Reparaturfähigkeit von humanen ATM^{-/-}-, ATM^{+/-}- und ATM^{+/+}-Zellen und in einer anderen Studie die Mäusezellen dieser drei Genotypen (Kato *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2006). Nach einmaliger Bestrahlung mit 1 Gy konnten sie in beiden Studien zwar Differenzen der Foci-Zahlen zwischen den ATM-heterozygoten und den gesunden Individuen feststellen, aber übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit waren sie nicht signifikant. Kato *et al.* konnten deutlichere Unterschiede nach einer kontinuierlichen Bestrahlung über 24 h mit einer Dosis von 10 cGy/h aufzeigen und schlugen dies als möglichen Ansatz zur klaren Unterscheidung zwischen ATM^{+/-} und ATM^{+/+} vor.

5.2.1.3 Vergleich der ATM-Homozygoten und Gesunden

Der Vergleich der Foci-Anzahl der ATM^{-/-} mit den ATM^{+/+} legte bis auf eine Ausnahme zu allen Reparaturzeitpunkten signifikante Unterschiede offen. Dies kann als Zeichen der reduzierten Reparaturfähigkeit der an Ataxia teleangiectasia erkrankten Menschen gewertet werden.

Rübe *et al.* verglichen in einer Studie unter anderem die Reparaturkapazität von gesunden Mäusen und ATM^{-/-}-Mäusen und konnten zeigen, dass die ermittelte Foci-Anzahl zu früheren Reparaturzeitpunkten bei den beiden Genotypen ähnlich war, während sich zu späteren Fixierungszeitpunkten bei den ATM^{-/-}-Mäusen erhöhte Foci-Zahlen nachweisen ließen (Rübe *et al.*, 2008). Dies ist kongruent mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Abbildung 5 und 6).

Kato *et al.* beobachteten beim Vergleich der Foci-Zahlen humaner Zellen nach Bestrahlung mit 1 Gy ebenfalls klare Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Kato *et al.*, 2006). Wie bereits aufgeführt stellten sie bei ihren Versuchen allerdings ein verspätetes Maximum der Anzahl der γ H2AX-Foci bei den ATM^{-/-} fest und deuteten dies als eine verlangsamte initiale Phosphorylierung. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit ist keine verzögerte Entwicklung der maximalen Foci-Anzahl bei den ATM-Homozygoten nachweisbar.

In einer anderen Studie wurden nach Bestrahlung mit 2 Gy und einem Fixierungszeitpunkt von 30 Minuten vergleichbare Foci-Zahlen bei ATM-homozygoten und gesunden humanen Zelllinien erfasst und es konnte nur kurz nach der Bestrahlung eine leicht verzögerte Kinetik der Foci-Entstehung bei den ATM^{-/-} festgehalten werden (Stiff *et al.*, 2004). Bei der Untersuchung embryonaler Fibroblasten von Mäusen ermittelten Stiff *et al.* bereits 15 Minuten nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy ähnliche Foci-Zahlen bei den ATM^{-/-} und gesunden Individuen.

Rübe *et al.* ermittelten mit dieser Arbeit kompatible Ergebnisse (Rübe *et al.*, 2010). So konnten sie beispielsweise bei den ATM^{+/+} zum Fixierungszeitpunkt von 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy $\sim 1,0 \pm 0,2$ Foci/Zelle und nach Bestrahlung mit 2 Gy $\sim 2,4 \pm 0,4$ Foci/Zelle aufzeigen. In der vorliegenden Arbeit offenbarten sich zu diesem Reparaturzeitpunkt $\sim 1,0 \pm 0,2$ Foci/Zelle (1 Gy) sowie $\sim 2,3 \pm 0,3$ Foci/Zelle (2 Gy).

Riballo *et al.* beobachteten in den ersten 4 Stunden nach Bestrahlung mit 1,3 Gy eine ähnliche Kinetik der Foci-Entstehung sowie ihres Verschwindens bei ATM^{-/-} und gesunden Zellen, wobei zu späteren Reparaturzeitpunkten eine erhöhte Foci-Anzahl bei den ATM^{-/-} persistierte (Riballo *et al.*, 2004). Obgleich sich in der vorliegenden Arbeit bereits zu früheren Reparaturzeitpunkten Unterschiede der Foci-Anzahl zwischen den beiden Genotypen ergaben, wurde im Einklang mit den Ergebnissen von Riballo *et al.* die Persistenz von DNA-DSB bei

den ATM^{-/-} zu späteren Fixierungszeitpunkten immer eindrücklicher. Dies bekräftigt den Sachverhalt, dass an Ataxia teleangiectasia erkrankte Patienten eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen aufweisen (Higurashi und Conen, 1973; Taylor *et al.*, 1975; Gatti, 2001; Sun *et al.*, 2002).

5.2.1.4 Vergleich der unbestrahlten Kontrollzählungen

Es zeigten sich signifikante Unterschiede bei den unbestrahlten Kontrollzählungen im Vergleich aller Patientenkollektive untereinander.

Die Phosphorylierung von H2AX findet auch in unbestrahlten Zellen statt (Rübe *et al.*, 2008). Die Entstehung von γ H2AX wird beispielsweise während der Apoptose bei der DNA-Fragmentation induziert (Rogakou *et al.*, 2000). Ferner wird H2AX im Verlauf der Mitose, sowie vermutlich im Rahmen natürlich vorkommender DNA-DSB phosphoryliert (McManus und Hendzel, 2005). Möglicherweise scheint auch die Reparatur dieser natürlich vorkommenden DSB bei Individuen mit eingeschränkter bzw. mangelhafter ATM-Funktion verlangsamt zu sein, wodurch es in unbestrahlten Proben ebenfalls zur verlängerten Persistenz einer geringfügig erhöhten Anzahl an DSB kommt.

Eines der Kennzeichen des Krankheitsbildes Ataxia teleangiectasia ist die genetische Instabilität, die sich unter anderem in Form einer erhöhten Rate chromosomaler Brüche äußert (Kojis *et al.*, 1991; Meyn, 1999; Taylor, 2001). Daher könnte man mutmaßen, dass aufgrund dieser Instabilität die ATM-Homozygoten und in geringerem Ausmaß auch die ATM-Heterozygoten eine erhöhte Rate spontan auftretender DSB darbieten.

5.2.1.5 Zusammenfassende Interpretation

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse eine deutliche Einschränkung der DNA-DBS-Reparaturkapazität der an Ataxia teleangiectasia erkrankten Kinder im Vergleich zu den Eltern sowie gesunden Individuen. Weniger große Unterschiede in der DNA-Reparatur konnten zwischen den ATM-Heterozygoten und den Gesunden aufgezeigt werden.

Die Diskrepanzen der DNA-Reparaturfähigkeit der verschiedenen Genotypen werden insbesondere deutlich, wenn der prozentuale Anteil der Zellen, die überhaupt Foci aufweisen im zeitlichen Verlauf betrachtet wird (Abbildung 7 und 8). Äußerst eindrücklich stellt sich hierbei die Persistenz einer erhöhten Anzahl von DSB nach dem Fixierungszeitpunkt von 24 h dar.

5.2.2 Vergleich der Immunfluoreszenzfärbungen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die ermittelten Foci-Zahlen der verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen zu den einzelnen Fixierungszeitpunkten separat für jedes Patientenkollektiv jeweils untereinander verglichen.

5.2.2.1 Vergleich der γ H2AX- und der 53BP1-Färbung

Die Gegenüberstellung der γ H2AX- und der 53BP1-Färbung ergab bei allen drei Genotypen bis auf wenige Einzelfälle keine signifikanten Differenzen der Foci-Zahlen zu den verschiedenen Reparaturzeitpunkten. Dieses Ergebnis deckt sich mit der in der Literatur wiederholt aufgeführten Kolo-kalisation von γ H2AX und 53BP1 am DNA-Doppelstrangbruch (Schultz *et al.*, 2000; Rappold *et al.*, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2003; Rube *et al.*, 2010; Groesser *et al.*, 2011). Es bestätigt die Fähigkeit jedes einzelnen Immunfluoreszenzmarkers für sich DNA-DSB zu quantifizieren.

5.2.2.2 Vergleich der γ H2AX- und der ATM-Färbung

Die statistische Vergleichsanalyse der γ H2AX- mit der ATM-Immunfluoreszenzfärbung offenbarte bei den ATM^{-/-} nach Bestrahlung mit 1 Gy mit Ausnahme des Fixierungszeitpunktes von 0,25 h zu allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede. Ferner zeigten sich signifikante Diskrepanzen nach Bestrahlung mit 2 Gy am 2,5 h Reparaturzeitpunkt.

Zunächst ist festzuhalten, dass die Bindung der Antikörper an die ATM-Proteine der ATM^{-/-}-Lymphozyten trotz Mutationen möglich war, da IRIF nachweisbar waren. Allerdings gestaltete sich die Auszählung der ATM-Foci schwierig, da oftmals eine starke Hintergrundfärbung bestand und die Foci zum Teil unterschiedlich intensiv leuchteten. Die erschwerte Auswertung könnte zu den teilweise diskrepanten Ergebnissen bei den ATM^{-/-} beitragen. Die beobachteten Hintergrundfärbungen könnten außerdem als Hinweis auf die eingeschränkten Funktionen der ATM-Proteine gedeutet werden.

Betrachtet man die absoluten Foci-Zahlen (Tabelle 20) fällt auf, dass sich zu den späteren Fixierungszeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy bei der ATM-Immunfluoreszenzfärbung erhöhte Foci-Zahlen im Vergleich zu den anderen Immunfluoreszenzfärbungen nachweisen ließen. Dies könnte als Resultat einer verlangsamten Loslösung der ATM-Proteine von der Bruchstelle interpretiert werden. Eine solche Auslegung ist insofern schwierig, da sie sich nicht auf die Ergebnisse der Bestrahlung mit 2 Gy übertragen lassen kann. Ein

Erklärungsversuch dieser Diskrepanz könnte sein, dass die ATM-Proteine aufgrund der Mutationen unregelmäßig an die DNA-Doppelstrangbrüche binden und es bei Bestrahlungsdosen von 2 Gy zu Überlagerungen der Immunfluoreszenzsignale kommt, weshalb ein Teil der DSB gewissermaßen maskiert wird.

Weiterhin weisen die an Ataxia teleangiectasia erkrankten Kinder unterschiedliche Mutationen auf. Dies könnte zu ungleichen Ergebnissen der absoluten Foci-Zahlen führen, da bei den einen Individuen der ATM-Antikörper womöglich gesteigert, bei den anderen mitunter weniger stark an die mutierten Proteine bindet und so ein nicht immer einheitliches Bild entsteht.

Ferner fällt auf, dass nach einem Fixierungszeitpunkt von 0,25 h bei beiden Bestrahlungsdosen die absolute Foci-Anzahl bei der ATM-Färbung im Vergleich zu den anderen Färbungen niedriger ist. Dies könnte womöglich Ausdruck einer verzögerten Bindung der mutierten Proteine an die DSB sein.

Der Vergleich der Foci-Werte der γ H2AX- mit der ATM-Färbung ergab, abzüglich weniger Ausnahmen, weder bei den heterozygoten noch bei den gesunden Individuen signifikante Differenzen. Dies steht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Kolo-kalisation der beiden Marker am DSB (Suzuki *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2010).

5.2.2.3 Vergleich der 53BP1- und der ATM-Färbung

Der Gegenüberstellung der Foci-Zahlen der 53BP1- mit der ATM-Färbung zeigte bei den ATM^{-/-} und den ATM^{+/-} zu späteren Reparaturzeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy, sowie bei der unbestrahlten Kontrolle von ATM^{+/-} signifikante Unterschiede auf. Nach Bestrahlung mit 2 Gy ergaben sich keine signifikanten Differenzen. Die Ergebnisse der ATM-Homozygoten könnte man in ähnlicher Weise deuten wie es beim Vergleich der γ H2AX und ATM-Immunfluoreszenzfärbung erfolgt ist, da die absoluten Foci-Werte der γ H2AX- und der 53BP1-Färbung in einer sehr ähnlichen Größenordnung liegen (Tabelle 20). Dass sich bei den ATM-Heterozygoten auch signifikante Unterschiede offenbarten, könnte als Hinweis auf die eingeschränkte Funktion des ATM-Proteins interpretiert werden. Da sich hier vornehmlich zu den späteren Reparaturzeitpunkten signifikante Unterschiede der absoluten Foci-Zahlen aufzeigen ließen, könnte es sich auch hierbei um eine verzögerte Ablösung der ATM-Proteine vom DSB handeln. Dass sich diese Differenzen bei Bestrahlungsdosen von 2 Gy nicht zeigten, könnte sich auch hier aus einer Überlagerung von Foci-Signalen aufgrund einer ungleichmäßigen Bindung der funktionseingeschränkten Proteine am DNA-DSB ergeben.

Bei den gesunden Individuen zeigten sich zu keinem Fixierungszeitpunkt signifikante Diskrepanzen zwischen den Foci-Zahlen. Dies steht im Einklang mit der in der Literatur aufgeführten Kolo-kalisierung der beiden DSB-Marker (Su *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010).

5.2.2.4 Zusammenfassende Interpretation

Zusammenfassend können die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die Immunfluoreszenzfärbung von phosphoryliertem ATM bei Individuen mit intakten ATM-Proteinen ein zweckmäßiges Verfahren zur Darstellung und Auszählung von DNA-Doppelstrangbrüchen ist, da sich mit der Färbung von phosphoryliertem H2AX und 53BP1 vergleichbare Ergebnisse erzielen ließen.

Mäßig anwendbar ist die ATM-Färbung bei Individuen mit eingeschränkter Funktion des ATM-Proteins. Hier sind die γ H2AX- oder die 53BP1-Immunfluoreszenzfärbung offenbar die geeigneteren Methoden zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen.

5.3 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den Sachverhalt, dass an Ataxia teleangiectasia leidende Patienten eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen aufweisen, die an einer erhöhten Anzahl zurückbleibender DNA-Doppelstrangbrüche erkennbar wird. Ferner verdeutlichen die Ergebnisse eine etwas eingeschränkte Reparaturkapazität bei ATM-Heterozygoten.

Während ATM-Homozygotie anhand der klinischen Symptomatik meist sehr früh erkannt wird, ist dies bei ATM-Heterozygotie, die immerhin bei etwa 1% der Bevölkerung vorliegt, in der Regel nicht der Fall.

Eine Einschätzung der individuellen Effektivität DNA-Doppelstrangbrüche reparieren zu können, wäre gerade vor dem Beginn einer Strahlen- oder Chemotherapie von Relevanz. Je nach Ausmaß eines eventuell vorliegenden Reparaturdefizits könnte so eine auf den einzelnen Patienten angepasste Therapie ausgearbeitet werden.

Ferner reagieren auch gesunde Menschen unterschiedlich auf verschiedene Therapien. Beispielsweise ergeben sich nach Anwendung einer Radiotherapie trotz Verabreichung derselben Dosis individuell unterschiedlich stark ausgeprägte akute und späte Gewebsreaktionen (Turesson, 1990; Tucker *et al.*, 1992 Bentzen und Overgaard, 1994; Dikomey *et al.*, 2003).

Eine mögliche Konsequenz, die sich aus der Kenntnis über das Vorliegen und Ausmaß einer Funktionseinschränkung zur DNA-Reparatur ergeben könnte, wäre beispielsweise die Beschränkung der Anwendung diagnostischer und therapeutischer Röntgenstrahlen auf das Nötigste.

Vor diesem Hintergrund wäre die Immunfluoreszenzmethode ein einfaches Screening-Verfahren zur Erfassung einer möglicherweise eingeschränkten Fähigkeit zur DNA-Reparatur. Dies könnte als routinemäßige Diagnostik erfolgen und so eine auf den jeweiligen Patienten abgestimmte Therapie zulassen (Rübe *et al.*, 2010).

Die individuelle Einschätzung der DSB-Reparaturkapazität jedes einzelnen Patienten vor Einleitung einer Therapie wäre ein wünschenswertes Ziel für die Zukunft.

6. Literaturverzeichnis

1. Abraham RT (2004) PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair* 3:883-887
2. Ali A, Zhang J, Bao S, Liu I, Otterness D, Dean NM, Abraham RT, Wang XF (2004) Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev* 18:249-254
3. Athma P, Rappaport R, Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92:130-134
4. Baumann M, Hölscher T, Begg AC (2003) Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol* 69:121-125
5. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506
6. Bentzen SM (2006) Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 6:702-713
7. Bentzen SM, Overgaard J (1994) Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Semin Radiat Oncol* 4:68-80
8. Bernstein NK, Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Mani R, Dianov G, Glover JN, Weinfeld M (2008) Polynucleotide kinase as a potential target for enhancing cytotoxicity by ionizing radiation and topoisomerase I inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* 8:358-367
9. Boder E, Sedgwick RP (1958) Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* 21:526-554
10. Broeks A, Urbanus JH, Floore AN, Dahler EC, Klijn JG, Rutgers EJ, Devilee P, Russell NS, van Leeuwen FE, van 't Veer LJ (2000) ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am J Hum Genet* 66:494-500
11. Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM, Chen DJ (1997) DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4267-4272
12. Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM, Nussenzweig A (2003) H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* 114:371-383
13. Chan DW, Lees-Miller SP (1996) The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 271:8936-8941
14. Chen PC, Lavin MF, Kidson C, Moss D (1978) Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer prone population. *Nature* 274:484-486
15. Chun HH, Gatti RA (2004) Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair* 3:1187-1196
16. Concannon P (2002) ATM heterozygosity and cancer risk. *Nat Genet* 32:89-90
17. Costes SV, Chiolo I, Pluth JM, Barcellos-Hoff MH, Jakob B (2010) Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat Res* 704:78-87

18. Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 7:588-598
19. Dar I, Biton S, Shiloh Y, Barzilai A (2006) Analysis of the ataxia telangiectasia mutated-mediated DNA damage response in murine cerebellar neurons. *J Neurosci* 26:7767-7774
20. DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J* 21:3192-3200
21. de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001): Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 8:1129-1135
22. Dikomey E, Borgmann K, Peacock J, Jung H (2003) Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56:1194-1200
23. Dörk T, Bendix-Waltes R, Wegner RD, Stumm M (2004) Slow progression of ataxia-telangiectasia with double missense and in frame splice mutations. *Am J Med Genet A* 126A:272-277
24. Falck J, Coates J, Jackson SP (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434:605-611
25. Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A (2002) DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* 4:993-997
26. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3:959-967
27. Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP (1997) Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 72:271-283
28. Fricke, A (2008) Untersuchungen zur Chromatinstruktur und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in menschlichen Zellen mittels ionisierender Strahlung, Dissertation, TU Darmstadt, Darmstadt
29. Gatti RA (2001) The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* 40:702-711
30. Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K, Lathrop GM, Leppert M, Nakamura Y, O'Connell P, Paterson M, Salser W, Sanal O, Silver J, Sparkes RS, Susi E, Weeks DE, Wei S, White R, Yoder F (1988) Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336:577-580
31. Gatti R (1993-1999) Ataxia-Telangiectasia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. University of Washington, Seattle
32. Goldberg M, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, Bartek J, Jackson SP (2003) MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421:952-956
33. Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GB, Lees-Miller SP, Khanna KK (2004) Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J* 23:4451-4461

34. Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Löbrich M, Jeggo PA (2008) ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* 31:167-177
35. Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ (1967) Ataxia telangiectasia. Neoplasia, untoward response to x-irradiation, and tuberous sclerosis. *Am J Dis Child* 114:617-625
36. Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388:492-495
37. Groesser T, Chang H, Fontenay G, Chen J, Costes SV, Helen Barcellos-Hoff M, Parvin B, Rydberg B (2011) Persistence of γ -H2AX and 53BP1 foci in proliferating and non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to γ -rays or iron ions. *Int J Radiat Biol* 87:696-710
38. Hentges P, Ahnesorg P, Pitcher RS, Bruce CK, Kysela B, Green AJ, Bianchi J, Wilson TE, Jackson SP, Doherty AJ (2006) Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J Biol Chem* 281:37517-37526
39. Higurashi M, Conen PE (1973) In vitro chromosomal radiosensitivity in "chromosomal breakage syndromes". *Cancer* 32:380-383
40. Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-696
41. Jeggo P, Löbrich M (2006) Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* 122:124-127
42. Kao GD, McKenna WG, Guenther MG, Muschel RJ, Lazar MA, Yen TJ (2003) Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *J Cell Biol* 160:1017-1027
43. Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Little JB, Bedford JS (2006) Levels of gamma-H2AX Foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two at families and in another apparently normal individual. *Radiat Res* 166:443-453
44. Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Genik PC, Little JB, Bedford JS (2006) gamma-H2AX foci after low-dose-rate irradiation reveal atm haploinsufficiency in mice. *Radiat Res* 166:47-54
45. Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247-254
46. Kegel P, Riballo E, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M (2007) X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair* 6:1692-1697
47. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36:5678-5694
48. Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauchi H (2008) Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res* 49:93-103
49. Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, Komatsu K (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 12:1846-1851

50. Kojis TL, Gatti RA, Sparkes RS (1991) The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* 56:143-156
51. Kozlov SV, Graham ME, Peng C, Chen P, Robinson PJ, Lavin MF (2006) Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J* 25:3504-3514
52. Krieger H, Petzold W (1992) *Strahlenphysik, Dosimetrie und Strahlenschutz, Band 1 Grundlagen*. B.G. Teubner, Stuttgart
53. Kühne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Löbrich M (2004) A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res* 64:500-508
54. Lavin MF (2008) Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:759-769
55. Lavin MF, Gueven N, Bottle S, Gatti RA (2007) Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. *Br Med Bull* 81-82:129-147
56. Lavin MF, Kozlov S (2007) ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6:931-942
57. Lee JH, Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308:551-554
58. Lees-Miller SP, Meek K (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85:1161-1173
59. Lewanski CR, Gullick WJ (2001) Radiotherapy and cellular signalling. *Lancet Oncol* 2:366-370
60. Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283:1-5
61. Linding R, Jensen LJ, Ostheimer GJ, van Vugt MA, Jørgensen C, Miron IM, Diella F, Colwill K, Taylor L, Elder K, Metalnikov P, Nguyen V, Pasculescu A, Jin J, Park JG, Samson LD, Woodgett JR, Russell RB, Bork P, Yaffe MB, Pawson T (2007) Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell* 129:1415-1426
62. Lindl T, Gstraunthaler G (2008) *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
63. Löbrich M, Jeggo PA (2005) Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair* 4:749-759
64. Löbrich M, Jeggo PA (2005) The two edges of the ATM sword: co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol* 76:112-118
65. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA (2010) gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9:662-669
66. Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 21:187-200
67. Louis-Bar D (1941) Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Confinia Neurologica* 4:32-42

68. Lottspeich F, Engels J (2006) *Bioanalytik*. Elsevier, München
69. Lu H, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2007) Length-dependent binding of human XLF to DNA and stimulation of XRCC4.DNA ligase IV activity. *J Biol Chem* 282:11155-11162
70. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108:781-794
71. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417:639-650
72. Mailand N, Bekker-Jensen S, Fastrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J (2007) RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131:887-900
73. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160-1166
74. McManus KJ, Hendzel MJ (2005) ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16:5013-5025
75. Meyn MS (1999) Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet* 55:289-304
76. Mirzoeva OK, Petrini JH (2003) DNA replication-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cancer Res* 1:207-218
77. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V (2004) *Transfusionsmedizin*. Springer, Berlin Heidelberg New York
78. Perlman S, Becker-Catania S, Gatti RA (2003) Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Neurol* 10:173-182
79. Peterson RD, Kelly WD, Good RA (1964) Ataxia-telangiectasia. Its association with a defective thymus, immunological-deficiency disease, and malignancy. *Lancet* 1:1189-1193
80. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P (2010) H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids*. pii:920161
81. Ramsden DA, Gellert M (1995) Formation and resolution of double-strand break intermediates in V(D)J rearrangement. *Genes Dev* 9:2409-2420
82. Rappold I, Iwabuchi K, Date T, Chen J (2001) Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol* 153:613-620
83. Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA (2009) γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res* 43:1171-1178
84. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12:162-169
85. Reiser M, Kuhn FP, Debus J (2011) *Radiologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart

86. Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M (2004) A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* 16:715-724
87. Roberts NJ, Jiao Y, Yu J, Kopelovich L, Petersen GM, Bondy ML, Gallinger S, Schwartz AG, Syngal S, Cote ML, Axilbund J, Schulick R, Ali SZ, Eshleman JR, Velculescu VE, Goggins M, Vogelstein B, Papadopoulos N, Hruban RH, Kinzler KW, Klein AP (2012) ATM Mutations in Patients with Hereditary Pancreatic Cancer. *Cancer Discovery* 2:41-46
88. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916
89. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 275:9390-9395
90. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868
91. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706-5715
92. Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5057-5062
93. Rube CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, Gräber S, Graf N, Rube C (2010) DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78:359-369
94. Rube CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rube C (2008) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14:6546-6555
95. Rube CE, Lorat Y, Schuler N, Schanz S, Wennemuth G, Rube C (2011) DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair* 10: 427-437
96. Sanal O, Ersoy F, Yel L, Tezcan I, Metin A, Ozyürek H, Gariboglu S, Fikrig S, Berkel AI, Rijkers GT, Zegers BJ (1999) Impaired IgG antibody production to pneumococcal polysaccharides in patients with ataxia-telangiectasia. *J Clin Immunol* 19:326-334
97. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268:1749-1753
98. Sato K, Nishikino M, Okano Y, Ohshima S, Hasegawa N, Ishino M, Kawachi T, Numasaki H, Teshima T, Nishimura H (2010) γ -H2AX and phosphorylated ATM focus formation in cancer cells after laser plasma X irradiation. *Radiat Res* 174:436-445
99. Schmitz S (2009) *Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

100. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151:1381-1390
101. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM (2002) Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158:486-492
102. Seyffert W (2003) *Lehrbuch der Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
103. Shiloh Y (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31:402-410
104. Shreeram S, Demidov ON, Hee WK, Yamaguchi H, Onishi N, Kek C, Timofeev ON, Dudgeon C, Fornace AJ, Anderson CW, Minami J, Appella E, Bulavin DV (2006) Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Mol Cell* 23:757-764
105. Shrivastav M, Miller CA, De Haro LP, Durant ST, Chen BP, Chen DJ, Nickoloff JA (2009) DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA Repair* 8:920-929
106. Siegenthaler S, Blum HE (2006) *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
107. Sonada E, Hochegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S (2006) Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair* 5:1021-1029
108. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ (2003) MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421:961-966
109. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 64:2390-2396
110. Stokes GG (1880-1905) *Mathematical and Physical Papers*. Vol I-V Cambridge University Press, Cambridge
111. Su Y, Meador JA, Geard CR, Balajee AS (2010) Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system. *Exp Dermatol* 19:16-22
112. Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13182-13187
113. Sun X, Becker-Catania SG, Chun HH, Hwang MJ, Huo Y, Wang Z, Mitui M, Sanal O, Chessa L, Crandall B, Gatti RA (2002) Early diagnosis of ataxia-telangiectasia using radiosensitivity testing. *J Pediatr* 140:724-731
114. Suzuki K, Okada H, Yamauchi M, Oka Y, Kodama S, Watanabe M (2006) Qualitative and quantitative analysis of phosphorylated ATM foci induced by low-dose ionizing radiation. *Radiat Res* 165:499-504
115. Suzuki K, Takahashi M, Oka Y, Yamauchi M, Suzuki M, Yamashita S (2010) Requirement of ATM-dependent pathway for the repair of a subset of DNA double strand breaks created by restriction endonucleases. *Genome Integr* 1:4

116. Swift M (1985) Genetics and epidemiology of ataxia-telangiectasia. *Kroc Found Ser* 19:133-146
117. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 325:1831-1836
118. Swift M, Sholman L, Perry M, Chase C (1976) Malignant neoplasms in the families of patients with ataxia-telangiectasia. *Cancer Res* 36:209-215
119. Syllaba L, Henner K (1926) Contribution à l'étude de l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Revue neurologique* 1:541-562
120. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17:5497-5508
121. Tavani F, Zimmermann RA, Berry GT, Sullivan K, Gatti R, Bingham P (2003) Ataxia-telangiectasia: the pattern of cerebellar atrophy on MRI. *Neuroradiology* 45:315-319
122. Taylor AM (2001) Chromosome instability syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* 14:631-644
123. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA (1975) Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258:427-429
124. Tichý A, Vávrová J, Pejchal J, Rezáčová M (2010) Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response. *Acta Medica* 53:13-17
125. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, Byrd P, Taylor M, Easton DF (2005) Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 97:813-822
126. Tsai CJ, Kim SA, Chu G (2007) Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7851-7856
127. Tucker SL, Turesson I, Thames HD (1992) Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer* 28A:1783-1791
128. Turesson I (1990) Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19:1569-1574
129. Uziel T, Savitsky K, Platzer M, Ziv Y, Helbitz T, Nehls M, Boehm T, Rosenthal A, Shiloh Y, Rotman G (1996) Genomic Organization of the ATM gene. *Genomics* 33:317-320
130. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22:5612-5621
131. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196-206
132. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412:607-614

133. Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ (2002) 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298:1435-1438
134. Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276:47759-47762
135. Ward IM, Minn K, Chen J (2004) UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. *J Biol Chem* 279:9677-9680
136. Weiß C (2010) *Basiswissen Medizinische Statistik*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg
137. Weterings E, Chen DJ (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18:114-124
138. Yoo S, Dynan WS (1999) Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* 27:4679-4686
139. You Z, Bailis JM, Johnson SA, Dilworth SM, Hunter T (2007) Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 9:1311-1318
140. You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 25:5363-5379
141. Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-439

7. Dank

Mein besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. med. C. E. Rube für die Überlassung des Themas der Dissertation.

Herrn Dr. rer. nat. Andreas Fricke danke ich für die gute Betreuung im Labor und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Weiterhin danke ich Nadine Schuler, Stefanie Schanz und Daniela Ludwig für die ständige Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für den lieben Rückhalt.

